



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

MOLECULAR Y CELULAR

TESIS PROFESIONAL

“El efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en la actividad respiratoria y citocrómica de *Escherichia coli* uropatógena”

PARA OBTENER EL TITULO DE LICENCIADA EN BIOMEDICINA

TESIS QUE PRESENTA

Flor de Claudia Hernández Hernández

DIRECTOR DE TESIS

D.C. Marcos Flores Encarnación

PUEBLA, PUEBLA JUNIO 2025

Agradecimientos

Esta Tesis es un logro muy importante y con el cual concluyo una etapa mas en mi vida. A lo largo de este proyecto tuve el apoyo, inspiracion, foratelza, paciencia y esucha de Dios, mi familia y mi director de tesis. Es gracias a ellos que el sueño de convertirme en una profesionista sea hoy una realidad y que tanto sus palabras como sus consejos, sean hoy el motivo por el cual continúe creciendo como persona.

Agradezco primeramente a mi Padre, Victor Hernández Mancera, el hombre que fue mi inspiracion y el motivo de estudiar Biomedicina. Papá, hoy que ya no estas conmigo quiero decirte que tu amor sigue presente en mi mente y en mi corazón; que tus consejos y tu crianza ahora son el reflejo de la mujer en la que me he convertido; que hoy triunfamos los dos juntos pues fuiste y siémpre seras un gran ejemplo de valentia, lucha y fortaleza. Te amo Papá.

Agradezco tambien a mi Madre, Claudia Hernández Moneda, quien me ha inculcado valores, me ha dado su apoyo y amor incondicionales, que ha estado para mi en las buenas y en las malas; y que a lo largo de mi vida ha sido un gran ejemplo de mujer fuerte e independiente. Mamá te amo con todo mi corazón y hoy este trabajo es gracias a tu gran labor de madre estos 23 años de mi vida.

De igual forma agradezco a mi director de Tesis, Marcos Flores Encarnación, quien me ha apoyado y escuchado desde los incios de la licenciatura, un ejemplo de docente admirable, un gran amigo y tambien una gran inspiracion para mi vida profesional. Gracias infinitas Doctor por su ardua labor como mi tesista y mi maestro; por su paciencia, su escucha y sus sabios consejos.

Por ultimo quiero agradecer a mi abuelita Ana Maria Moneda Bautista y a mi hermana Victoria Hernández Hernández, dos mujeres que me han brindado su amor y su escucha a lo largo de mi vida, que me han aconsejado, que han sido el motivo de superarme como persona y de ser mejor día con día. Las amo mucho.

Índice

1. Resumen.....	6
2. Introducción	7
3. Antecedentes	12
3.1 Antecedentes generales.....	12
3.2 Antecedentes específicos	17
4. Planteamiento del problema.....	20
5. Justificación.....	21
6. Hipótesis.....	22
7. Objetivos	23
7.1 Objetivo general:.....	23
7.2 Objetivos particulares:	23
8. Materiales y métodos	24
8.1 Material biológico y químico.....	24
8.2 Crecimiento de <i>E. coli</i> uropatógena.....	24
8.3 Determinación del efecto del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> sobre el crecimiento de la cepa de referencia de <i>E. coli</i> uropatógena.	24
8.4 Determinación del efecto de monoterpenos timol y carvacrol en el crecimiento de la cepa de referencia de <i>E. coli</i> uropatógena	25
8.5 Prueba de susceptibilidad a antibióticos de la cepa de referencia de <i>E. coli</i> uropatógena	25
8.6 Determinación del efecto del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> sobre una cepa de aislamiento clínico de <i>E. coli</i> uropatógena	25
8.7 Determinación del efecto de timol y carvacrol en el crecimiento de una cepa de aislamiento clínico de <i>E. coli</i> uropatógena	26

8.8 Prueba de susceptibilidad a antibióticos de una cepa de aislamiento clínico de <i>E. coli</i> uropatógena.....	26
8.9 Determinación de la actividad respiratoria en <i>E. coli</i> uropatógena y efecto del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i>	26
8.10 Análisis espectral de los citocromos de <i>E. coli</i> uropatógena y efecto del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i>	27
8.11 Análisis espectral de células de <i>E. coli</i> uropatógena irradiadas con luz ultravioleta	27
8.12 Esquema general de trabajo	29
9. Resultados	30
9.1 Efecto del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> sobre el crecimiento de la cepa de referencia de <i>E. coli</i> uropatógena	31
9.2 Efecto de timol y carvacrol en el crecimiento de la cepa de referencia de <i>E. coli</i> uropatógena.....	32
9.3 Perfil de susceptibilidad a antibióticos de la cepa de referencia de <i>E. coli</i> uropatógena	33
9.4 Efecto bactericida del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> sobre una cepa de aislamiento clínico de <i>Escherichia coli</i> uropatógena.....	35
9.5 Efecto de timol y carvacrol en el crecimiento de una cepa de aislamiento clínico de <i>E. coli</i> uropatógena.....	36
9.6 Perfil de sensibilidad o resistencia de cepa de aislamiento clínico de <i>E. coli</i> uropatógena a diferentes antibióticos	37
9.7 Actividad respiratoria y efecto del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> en <i>E. coli</i> uropatógena	38
9.8 Análisis espectral de células de <i>E. coli</i> uropatógena tratadas con aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> y reducidas con succinato	40

9.9 Análisis espectral de células de <i>E. coli</i> uropatógena tratadas con aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> y reducidas con glucosa.	42
9.10 Análisis espectral de células de <i>E. coli</i> uropatógena irradiadas con luz ultravioleta	43
10. Discusión.....	46
11. Conclusiones	54
12. Perspectivas.....	55
13. Referencias	56

Resumen

A lo largo de la historia se han empleado los tratamientos antibióticos ante diversas infecciones microbianas. Sin embargo hoy en día ante la problemática conocida como resistencia a antibióticos, se han buscado nuevas alternativas terapéuticas. Una de ellas es el uso de sustancias de origen vegetal conocidas como aceites esenciales, estos son compuestos obtenidos de extractos de plantas y que debido a sus diversas propiedades medicinales, se han estudiado los diferentes mecanismos que permiten una acción antimicrobiana.

En estudios previos se han probado una gran variedad de aceites esenciales ante cepas bacterianas características por poseer resistencia o multi resistencia a los antibióticos, demostrando una alta capacidad antibacteriana. Un ejemplo es el uso del aceite esencial de *Thymus vulgaris* que cuenta con un potente efecto inhibitorio ante cepas de *E. coli* uropatógena, teniendo conocimiento de que el aceite es capaz de penetrar la membrana bacteriana, formando poros y provocando una fuga de contenido citoplasmática. Sin embargo aún no se tiene conocimiento si otro mecanismo de acción podría estar enfocado en la actividad de la cadena respiratoria de la bacteria.

Introducción

La introducción de los antibióticos en la práctica clínica y su uso irracional propició un rápido aumento de infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples fármacos que ha culminado en una crisis de salud pública mundial, aumentando las tasas de morbilidad y mortalidad, esto gracias a la variedad de mecanismos de resistencia bacteriana y hoy en día también presente en otros microorganismos como hongos, virus y hasta en parásitos, dándoles la capacidad de sobrevivir y evadir la acción de dichos fármacos, conllevando a un deterioro en su eficacia en el organismo y con este un fracaso terapéutico (**Bisso-Andrade, 2018; Costa *et al*, 2022**).

Es por dicho motivo que se han dispuesto nuevas medidas profilácticas eficaces a partir de productos naturales con actividad antimicrobiana, estos son conocidos como aceites esenciales los cuales son considerados como potentes agentes antimicrobianos no tóxicos (**Romanescu *et al*, 2023**). Las plantas medicinales y aromáticas se conocen desde hace miles de años por sus propiedades terapéuticas y sus subproductos, los aceites esenciales, se han estudiado y caracterizado dándonos a conocer sus propiedades antimicrobianas. Algunos estudios han demostrado que los aceites esenciales son buenas alternativas terapéuticas a los antibióticos, para luchar contra infecciones locales y contra infecciones sistémicas (**Dupuis *et al*, 2022**).

Los aceites esenciales son mezclas complejas de decenas de compuestos lipofílicos y volátiles, en diferentes concentraciones como son los: terpenos, terpenoides, fenilpropanoides, entre otros; y representan metabolitos secundarios producidos por plantas aromáticas como un mecanismo de protección contra depredadores, microorganismos o condiciones climáticas austeras (**Brandes *et al*, 2024; Romanescu *et al*, 2023**).

Se ha demostrado que los monoterpenos y monoterpenoides, componentes críticos de los aceites esenciales, se han convertido en agentes prometedores para combatir patógenos multirresistentes a los fármacos, esto debido a su capacidad para alterar las membranas celulares, inhibir la formación de biopelículas y modular la expresión génica relacionada con la virulencia y la resistencia, reduciendo así la viabilidad microbiana mediante alteraciones

en el potencial de membrana, la actividad enzimática y la regulación genética (**Figura 1**) (Cho *et al.*, 2020; Kong *et al.*, 2025; Shahin *et al.*, 2025).

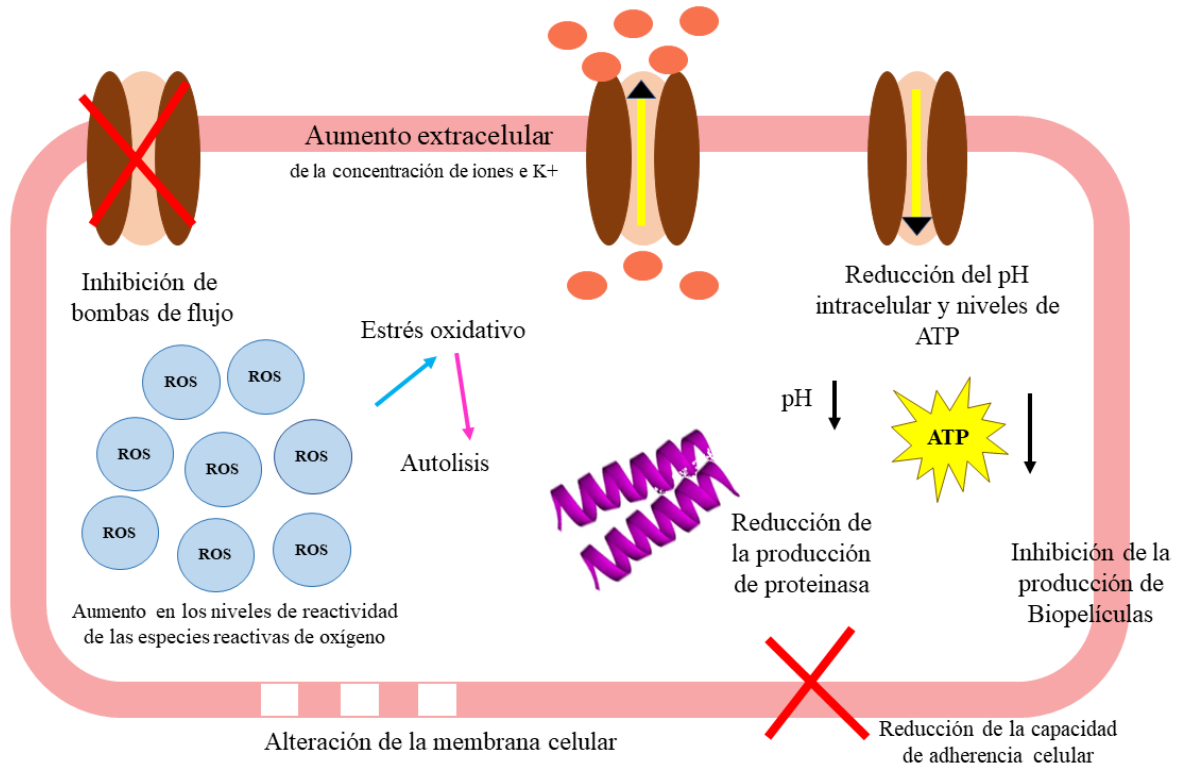


Figura 1. Representación esquemática de los mecanismos de acción de los monoterpenos dirigidos a las bacterias.

Informes anteriores han demostrado la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales contra varios microorganismos, incluidos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y varias especies de hongos (Brandes *et al.*, 2024). Comúnmente, las bacterias Gram positivas son más susceptibles a los terpenos que las Gram negativas; pues se ha propuesto que la estructura lipofílica de los componentes de los aceites esenciales altera las membranas celulares, lo que produce efectos antimicrobianos, aunque se desconocen los mecanismos específicos (Ike *et al.*, 2025).

A continuación, se presentan algunos ejemplos de aceites esenciales, sus componentes probados en diferentes microorganismos. (Tabla 1).

Tabla 1. Aceitese esenciales y sus componentes probados en diferentes microorganismos.

Microorganismo	Aceites esenciales	Componentes probados	Efectos	Referencias
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina	árbol de té (<i>Melaleuca alternifolia</i>), pachulí (<i>Pogostemon cablin</i>), lavanda (<i>Lavandula officinalis</i>)	Eugenol	Inhibición de producción de biopelículas, mejora los metabolitos secundarios, reducción de la acumulación de polisacáridos y la adhesión celular.	Buru et al., 2022; Edwards-Jones et al., 2004; Macêdo et al., 2022.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	casia, clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>), bálsamo del Perú (<i>Myroxylon balsamum</i>), tomillo rojo (<i>Thymus vulgaris</i>) y árbol de té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	Carvacrol	Alteración de la estructura del biofilm, sustancias poliméricas dirigidas	Kavanaugh & Ribbeck, 2012; Wang et al., 2022b.
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Menta negra (<i>Mentha x piperita</i>), Mayotana dulce (<i>Origanum majorana</i>), Tomillo silvestre (<i>Thymus serpyllum</i>), e Hinojo de Florencia (<i>Foeniculum vulgare</i>).	Gerianol Eugenol	Reducción de la producción de exopolisacáridos, alteración e inhibición de la biopelícula.	Choudhary et al., 2022; Sabo et al., 2024.

<i>Campylobacter jejuni</i>	Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>), Naranja (<i>Citrus sinensis</i>), Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L), Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	<i>p</i> -Cimeno	Inhibición de la bomba de flujo	Šimunović et al., 2020; Thanissery et al., 2014.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Oregano (<i>Origanum vulgare</i> L.), Árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	Carvacrol	Destrucción de la membrana celular, fuga de fondo intracelular, propiedad antibiótica, aumento de concentración de iones K ⁺ extracelulares.	Mechmechani et al., 2022; Qi et al., 2021; Sánchez-Tito et al., 2022.
<i>Salmonella Thyphimurium</i>	Albahaca africana (<i>Ocimum gratissimum</i> L.), Orégano mexicano (<i>Lippia graveolens</i>) y Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	Carvacrol Timol	Efectos antiinflamatorios, propiedades antioxidantes, reducción de la translocación bacteriana, crecimiento bacteriano inhibido.	Giovagnoni et al., 2020; Rubio-Ortega et al., 2018

<i>Escherichia coli</i> β-lactamasas de espectro extendido	Corteza de canela (Cinnamomum zeylanicum), Clavo (Syzygium aromaticum) y Flor de lavanda (Lavandula angustifolia)	Carvacrol	Desintegración de membranas celulares bacterianas, elevación de ROS, Aumento de la liberación de iones K ⁺ , ATP y ADN celular, propiedades antibiopelícula.	Khan et al., 2020; Zych et al., 2024.
<i>Candida albicans</i>	Eucalipto (Eucalyptus globulus), Clavo (Eugenia caryophyllus), Jazmin (Jasminum nudiflorum) y Lavanda (Lavandula angustifolia)	Carvacrol Timol Eugenol Metil eugenol	Producción reducida de proteínas	Agarwal et al., 2010; Shaban et al., 2020.
<i>Candida auris</i>	Orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.), Tomillo (Thymus vulgaris), Bergamota silvestre (Monarda fistulosa L.)	Carvacrol Timol Eugenol Metil eugenol	Reducción de la producción de proteínas y adherencia a las células huésped, estrés oxidativo, desintegración de membrana	Ismail et al., 2022; Tran et al., 2022.

Antecedentes

3.1 Antecedentes generales

La resistencia a los antimicrobianos es una de las preocupaciones de salud pública más urgentes a nivel mundial, la cual mantiene su persistencia debido al uso masivo e inadecuado de antibióticos. Esto, a su vez, resulta en la aparición/resurgimiento, evolución y propagación de patógenos multirresistentes, volviendo un desafío el tratamiento empírico en entornos clínicos (**Rahman et al., 2022**).

La *Escherichia coli* patógena se encuentra entre el grupo más crítico de bacterias que requiere el desarrollo rápido de nuevos antibióticos y estrategias de tratamiento innovadoras. Entre las cepas dañinas de *Enterobacteriaceae* extraintestinales, la *E. coli* uropatógena (UPEC) representa una amenaza significativa para la salud (**Rozwadowski, & Gawel, 2022**). Esta es responsable de la mayoría (70–90%) de infecciones del tracto urinario (ITU), las cuales pueden ser adquiridas en la comunidad o nosocomiales, donde se informa que las cepas de UPEC causan entre el 70 % y el 95 % de los casos adquiridos en la comunidad y el 50 % de los casos adquiridos en nosocomios (**Rahman et al., 2022**).

En la última década, varias cepas de UPEC han adquirido mecanismos de resistencia a antibióticos y algunas se han vuelto resistentes a todas las clases de antibióticos. Entre los mecanismos de resistencia más comunes destacan la presencia de una membrana externa la cual confiere una barrera crucial e impermeable al paso de químicos tóxicos, la modificación de proteínas de la membrana externa (flagelos, fimbrias, porinas, receptores de hierro y bombas de eflujo) que son responsables de varias funciones, tales como el transporte de antibióticos y hierro; la presencia de elementos genéticos móviles (transposones, integrones y plásmidos conjugativos) los cuales son los principales impulsores de la propagación de genes de resistencia; la formación de comunidades bacterianas similares a biopelículas, la presencia de capsula y la producción de diferentes enzimas β -lactamasas. (**Nasrollahian et al., 2024; Rodrigues et al., 2022; Rozwadowski, & Gawel, 2022**). El tratamiento habitual de las infecciones de vías urinarias se basa en cuatro agentes para la terapia de primera línea: nitrofurantoína, trimetoprima-sulfametoxazol, pivmecilinam y fosfomicina trometamina. También se recomiendan dos agentes alternativos: β -lactámicas y fluoroquinolonas (por

ejemplo, ciprofloxacino). Estas últimas, se han transferido a la última categoría de agentes y solo deben usarse cuando no haya otras opciones orales efectivas disponibles (**Zhou et al., 2023**). Sin embargo, estudios previos han demostrado que en diversos aislados de UPEC las mayores tasas de resistencia se presentan para los antibióticos tetraciclina (69,1%), seguido de sulfonamidas (59,3%), quinolonas en (49,4%) y betalactámicos (36,9%) (**Bunduki et al., 2021**).

La variación en la susceptibilidad de los patógenos a los antibióticos se ha ido complicando día a día por la propagación global de estas cepas resistentes junto con el inadecuado uso y consumo de los fármacos limitando el tratamiento, complicando las infecciones urinarias y aumentando la morbilidad y la mortalidad en la población (**Esposito et al., 2022; Kara et al., 2024**). Es por ello que se han ido desarrollando diversas estrategias alternativas, una de ellas está basada en el uso de sustancias de origen vegetal como son los aceites esenciales cuyas características antimicrobianas los han propuesto como una alternativa de seguridad ecológica y humana (**Amassmoud et al., 2023**).

Los aceites esenciales son líquidos oleosos aromáticos naturales producidos por las plantas (**Sattayakhom et al., 2023**), cuya composición es una mezcla de múltiples sustancias químicas como: compuestos fenólicos (p. ej., fenoles, fenilpropanoides, estilbenos y sus glucósidos), isoprenoides (p. ej., terpenos, carotenoides, lípidos de almacenamiento), alcaloides y aminoácidos especiales (aliína, canavanina), los cuales les brindan a las plantas mecanismos de defensa frente a posibles depredadores, como insectos o vertebrados e incluso, protección contra factores como la luz ultravioleta, desecación y obstaculizar el crecimiento de una amplia gama de patógenos (**Burgos & Morales, 2010; Hoffmann, 2020**). Estas cualidades de los aceites esenciales les han permitido tener diferentes aplicaciones como es en la agronomía, las aplicaciones sanitarias, la cosmética, la perfumería, la odontología, la agricultura, la alimentación y hasta ahora las más importantes, en la medicina y la industria farmacéutica (**de Sousa et al., 2023**).

Diversos trabajos hacen mención que estas cualidades que portan los aceites esenciales les han permitido ser estudiados y probados a nivel médico (**Tabla 2**). Algunos ejemplos de los aceites esenciales con dichas cualidades son el aceite esencial de Oregano (*Origanum vulgare*

L.), el cual, además de ser un potente antimicrobiano natural, también se caracteriza por ser un compuesto anticarcinogénico cuyo mecanismo de acción es deteniendo el ciclo celular y fomentando la apoptosis de células anormales en el organismo (**Arcila-Lozano et al., 2004**). Otro ejemplo a mencionar es el aceite esencial Canela (*Cinnamomum verum*), cuyos componentes Cinamaldehído y Epicatequina, permiten que el aceite esencial interactúe con los residuos cisteínico de la proteína Tau reduciendo significativamente su agregación (**Momtaz et al., 2017**). De igual manera el aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*) cuyos componentes monoterpénicos, además de tener acción expectorante al relajar el músculo liso bronquial, también es utilizado como antiespasmódico, ya que a través de la acción de sus componentes monoterpénicos, es capaz de inhibir la disponibilidad de calcio bloqueando a su vez la conducción nerviosa (**Dong et al., 2023; Gimeno-Gasca, 2001**). Es por ello que se les ha atribuido la posibilidad de ser una solución a la problemática de bacterias multirresistentes a fármacos, no solo ayudando en el tratamiento de enfermedades crónicas/degenerativas, sino también como compuestos antimicrobianos efectivos. (**Swamy et al., 2016**).

Se ha reportado que la actividad de los aceites esenciales depende de su composición y se ha observado que presentan diferentes mecanismos de acción (**Cáceres et al., 2020; Guimaraes et al., 2019**). Así se ha reportado que los aceites esenciales desestabilizan la arquitectura celular, dañando la integridad de las membranas y aumentando con ello la permeabilidad celular. Por ello, se produce la interrupción de las actividades celulares como la producción de energía, del transporte membranar y otras funciones relacionadas con el metabolismo (**Peluche et al., 2017**). Así la afectación se produce tanto en la envoltura externa de las células (alterando así la disposición de moléculas de ácidos grasos y la capa de fosfolípidos y polisacáridos), como a nivel citoplasmático dada la naturaleza lipofílica de los aceites esenciales (**Rani et al., 2022**). El efecto antibacteriano de los aceites esenciales también está relacionado con la interrupción de las bombas de protones y el agotamiento del ATP (**Issa et al., 2019**). Algunos autores han reportado que los aceites esenciales también evitan la secreción de toxinas bacterianas al modificar la membrana bacteriana y alterando el transporte transmembranar (**Lagha et al., 2019; Tariq et al., 2019**).

Algunos aceites esenciales pueden inhibir la red de detección de quórum de comunicación célula-célula mediada por varias moléculas de señal bacterianas (Swamy *et al.*, 2016). Sin embargo, este tema aún no está esclarecido del todo y se debe hacer aún más investigaciones acerca de la acción de cada uno de los aceites esenciales en patógenos específicos.

Tabla 2. Los aceites esenciales, composición y sus efectos.

Aceites	Componentes	Propiedades	Referencias
Menta (<i>Mentha piperita</i> L.)	α -pineno, β -pineno, sabineno, mirceno, <i>cis</i> -ocimeno, β -cariofileno, γ -terpineno, germacreno D, carvona (3,5%), <i>L</i> -mentol (38-70%), <i>L</i> -mentona (0,4-35%); isomentona (1,5-10%), acetato de mentilo (0-20%), eucaliptol (1,8-cineol) (0,4-12%), mentofurano (0,1-21%); limoneno (0,6-4,5%), pulegona (trazas-7%) y neoisomentol.	Estimulantes, estomáquicas, carminativas, antisépticas, antiparasitarias y combate de cefaleas.	Burgos & Morales, (2010); Hudz <i>et al.</i>, (2023)
Oregano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	Carvacrol (76,64-85,70%), ocimeno (3,61-5,00%), γ -terpineno (1,83-3,47%), β -bisaboleno (0,02-3,00%), E-cariofileno (0,98-2,93%), linalol (0,39-2,48%), timol (1,65-2,43%), borneol (0,26-1,35%) y mirceno (1,07%).	Anti-radical, anticarcinogénicas, alergeno, abortivas, antimicrobianas e inhibidoras de la mutagenicidad	Arcila-Lozano <i>et al.</i>, (2004); Walasek-Janusz <i>et al.</i>, (2024)

Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	p-cimeno (8,41%), γ -terpineno (30,90%), timol (47,59%), carvacrol (20,61%), linalol (3,25%), cariofileno (1,76%), terpinoleno (1,62%), β -mirceno (1,50%) y α -tuyeno (1,21%).	Inmunoestimulante, antiinflamatorio, espasmolítico, neurótropo, antimicrobiano, drenador renal, anticatarral.	Dong <i>et al.</i>, (2023); Gimeno-Gasca, (2001).
Laurel (<i>Laurus nobilis</i>)	1,8-cineol (30,8%), acetato de α -terpinilo (14,9%), metileugenol (8,1%), α -terpineol (8,0%), sabineno (7,9%) y terpinen-4-ol (6,0%).	Pediculicidas, rubefacientes, antioxidantes, citotóxicas, inmunomodularoras, antibacterianas, analgésicas, antiinflamatorias y antiagregantes plaquetarios	Stefanova <i>et al.</i>, (2020); Liu <i>et al.</i>, (2008).
Canela (<i>Cinnamomum verum</i>)	<i>trans</i> -cinamaldehído (61,9%), cinamilo (7,56%), eugenol (5,96%), anetol (4,43%), <i>trans</i> -cariofileno (4,04%), eucalipto (2,72%), p-cimeno (2,31) limoneno (1,57%).	Estomáquicas, antibacterianas, antifúngicas, prevención del Alzheimer, antiulcerosas y actividad hipoglucemiante	Ganić <i>et al.</i>, (2022); Verspohl <i>et al.</i>, (2005).
	Contiene 30 compuestos químicos diferentes, de los cuales el eugenol constituye la mayoría (50%). <i>El acetato de eugenilo</i> ,		Kumar <i>et al.</i>, (2022); Pastrana-

Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	el - <i>humuleno</i> y el - <i>cariofileno</i> constituyen el 10-40% restante.	Estomacal, antimicrobianas y antioxidantes.	Puche et al., (2017).
Romero (<i>Salvia rosmarinus</i>)	1,8-cineol (43,77%), alcanfor (12,53%), α -pineno (11,51%), β -pineno (8,16%), canfeno (4,55%), β -cariofileno (3,93%), limoneno (2,80%), p-Cimeno (1.23%).	Antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, hipolipemiantes, insecticida.	Flores-Villa et al., (2020).

3.2 Antecedentes específicos

E. coli es un anaerobio facultativo que codifica una cadena modular de transporte de electrones que contiene una multitud de deshidrogenasas intercambiables, transportadores de electrones quinol y oxidasas/reductasas terminales. Esta complejidad estructural proporciona a *E. coli* un enorme grado de flexibilidad metabólica permitiéndole formar un gradiente diferencial de electrones y protones a través de la membrana citoplasmática, conduciendo a la formación de un gradiente electroquímico para la formación final de ATP; además de permitirle a la bacteria colonizar y adaptarse a diversos nichos. A pesar de ser un anaerobio facultativo, estudios previos establecen que UPEC requiere respiración aeróbica durante la infección y para formar biopelículas (**Beebout et al., 2021; Price & Driessen; 2010**).

Los citocromos son hemoproteínas constituyentes de las cadenas transportadoras de electrones en las membranas citoplasmáticas de los microorganismos encargados del transporte fotosintético de electrones durante la respiración tanto anaerobia como aerobia (**Tikhonova & Popov., 2014**). UPEC codifica tres quinol oxidasas respiratorias aeróbicas: una oxidasa de hemo-cobre con bombeo de protones, citocromo *bo*, y dos oxidasas de tipo *bd* sin bombeo de protones, citocromo *bd I* y citocromo *bdII*. El citocromo *bo* es una quinol oxidasa de baja afinidad por el oxígeno optimizada transcripcional y bioquímicamente para su uso en tensiones de oxígeno atmosférico. Por el contrario, las oxidasas de tipo *bd* tienen

alta afinidad por el oxígeno y están optimizadas para su uso en bajas tensiones de oxígeno (Beebout *et al.*, 2021; Borisov & Verkhovsky, 2015; Jesse *et al.*, 2013).

El tomillo es un arbusto silvestre perenne, aromático y medicinal que pertenece a la familia Lamiaceae y es originario de la región mediterránea. Se han identificado más de 900 especies del género *Thymus* en todo el mundo entre estas *Thymus capitatus* (L.), *Thymus vulgaris* L. y *Thymus zygis* L. (Maniki *et al.*, 2023). Las especies de *Thymus* se han utilizado ampliamente como agentes antimicrobianos naturales y se han generalizado en la industria alimentaria, farmacéutica y de productos medicinales durante las últimas décadas (Bakó *et al.*, 2023). La hoja de tomillo y sus extractos, incluidos los aceites esenciales extraídos de los pelos glandulares del tomillo, se utilizan comercialmente en la industria alimentaria, especialmente como agentes aromatizantes añadidos a la carne y el pescado; y específicamente *Thymus vulgaris* se utilizaba ampliamente como medicina popular en la antigua Europa para el tratamiento de heridas, trastornos gastrointestinales y broncopulmonares, debido a sus propiedades antihelmínticas, expectorantes, sedantes, diaforéticas, cicatrizantes y antisépticas (Etri & Pluhár, 2024; Kowalczyk *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2023). Según informes previos, la actividad antimicrobiana probablemente esté influenciada por los compuestos principales (timol y carvacrol), lo que indica un mecanismo de muerte celular programada. Además, se ha identificado que otros compuestos menores (α - y γ -terpineno) tienen una función depuradora de radicales libres o inhibidores de la peroxidación lipídica (Bakó *et al.*, 2023; Dong *et al.*, 2023).

Estudios realizados previamente en el laboratorio, han demostrado que el aceite esencial de *T. vulgaris*, podría interferir con la colonización bacteriana y la formación de biopelículas en superficies para *E. coli* uropatógena; esto gracias a diversos mecanismos de acción enfocados en alterar y penetrar la membrana lipídica de las bacterias, haciéndola más permeable y provocando fugas de iones y citoplasma (lisis y muerte bacteriana) (Flores-Encarnación *et al.*, 2020). También se ha mencionado, que el efecto antibacteriano de dicho aceite esencial está relacionado con sus componentes, principalmente el timol, el cual conforma un 40% - 53% del total del aceite (Borugă *et al.*, 2014), y ha sido reportado por varios autores como un potente agente antimicrobiano, ya que es un compuesto capaz de desintegrar la membrana

externa de las bacterias, inhibe la germinación de esporas, el crecimiento y multiplicación celular en bacterias (**López-Ambrocio *et al.*, 2016**). De igual forma, se han demostrado los efectos antibacterianos de eugenol y carvacrol en *E. coli*, con una disminución del potencial de membrana al exponer las células microbianas a estos compuestos (**Khan *et al.*, 2017**). Se ha observado también que la sinergia de los componentes inhibe distintas rutas bioquímicas y enzimas; y les brinda la capacidad de actuar sobre las proteínas que se encuentran embebidas en la membrana citoplasmática (**Gimeno-Gasca, 2010**);). Sin embargo, aún falta más indagación en el tema con la finalidad de conocer si hay más de un mecanismo de acción por el aceite esencial de *T. vulgaris*.

Planteamiento del problema

T. vulgaris es un aceite esencial con propiedades antimicrobianas. Se ha demostrado su efecto fuertemente inhibitorio en el crecimiento de *E. coli* uropatógena, incluyendo cepas resistentes a antibióticos. En estudios previos realizados en el laboratorio se determinó que el aceite esencial de *T. vulgaris* tuvo un efecto fuertemente inhibitorio en el crecimiento de *E. coli* uropatógena. En su momento se comprobó que la actividad respiratoria de *E. coli* disminuyó considerablemente en presencia del aceite esencial. Por ello, se propuso que *T. vulgaris* debe presentar varios mecanismos de acción responsables de la inhibición del crecimiento bacteriano. Uno de ellos podría ser afectando la actividad respiratoria bacteriana a nivel de los citocromos.

Justificación

Diversos estudios realizados acerca de la actividad del aceite esencial de *T. vulgaris* ante bacterias multirresistentes como son *S. aureus*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *E. coli* uropatógena, permitiendo conocer un poco más acerca de su potente actividad bactericida, capaz de interferir con la colonización bacteriana, impedir la formación de biopelículas, el permeabilizar y despolarizar la membrana citoplasmática conllevando finalmente a una lisis celular. Todo esto ha llevado a considerar al aceite de *T. vulgaris* como una alternativa a la resistencia a antibióticos. En el laboratorio se ha observado previamente que el aceite esencial de *T. vulgaris* tiene un fuerte efecto inhibitorio en el crecimiento de *E. coli* uropatógena, por lo que se sospecha que dicho aceite esencial debe presentar más de un mecanismo de acción. Así esta propuesta pretende aportar evidencia de que el aceite esencial de *T. vulgaris* puede afectar también la actividad respiratoria de *E. coli* uropatógena, impidiendo la reducción de los componentes citocrómicos.

Hipótesis

H₀: El aceite esencial de *T. vulgaris* tiene un efecto inhibitorio en la actividad respiratoria y citocrómica de *E. coli* uropatógena.

H₁: El aceite esencial de *T. vulgaris* no tiene un efecto inhibitorio en la actividad respiratoria y citocrómica de *E. coli* uropatógena.

Objetivos

7.1 Objetivo general:

- Determinar el efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* en la actividad respiratoria y citocrómica de *E. coli* uropatógena.

7.2 Objetivos particulares:

- Determinar el efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* en el crecimiento de *E. coli* uropatógena.
- Determinar el efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* en la reducción de citocromos en células de *E. coli* uropatógena.

Materiales y métodos

8.1 Material biológico y químico

Para este estudio se empleó la cepa de referencia de *E. coli* uropatógena CFT073. También se empleó un aceite esencial comercial de *T. vulgaris*.

8.2 Crecimiento de *E. coli* uropatógena.

E. coli uropatógena se hizo crecer en placas de agar y caldos del medio soya tripticaseína. Los medios de cultivo fueron preparados y esterilizados en el laboratorio. A partir de un precultivo de 24 horas ($Ab_{560nm} = 2.5$) se inocularon tubos de vidrio conteniendo 5 mL de caldo soya tripticaseína que fueron incubados a 37°C durante 24 horas. Las placas de agar fueron sembradas por estría cruzada o en césped a partir de un precultivo como se mencionó anteriormente. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas.

8.3 Determinación del efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* sobre el crecimiento de la cepa de referencia de *E. coli* uropatógena.

Para determinar el efecto de *T. vulgaris* en el crecimiento de *E. coli* uropatógena se realizaron ensayos utilizando la técnica de difusión en agar. Para esto, se colocaron discos de papel filtro estériles (diámetro aproximado de 5 mm) en la superficie de una placa de agar soya tripticaseína, previamente sembrada en césped con *E. coli* uropatógena e incubada a 37 °C por 24 horas ($Ab_{560nm} = 1$). Luego, en cada disco de papel se colocaron diferentes cantidades del aceite esencial: 1.2 mg a 12 mg. Posteriormente las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas. Al término del tiempo se midieron los halos de inhibición del crecimiento.

8.4 Determinación del efecto de monoterpenos timol y carvacrol en el crecimiento de la cepa de referencia de *E. coli* uropatógena

Para determinar el efecto de los monoterpenos timol y carvacrol en el crecimiento de *E. coli* uropatógena, se siguió la metodología descrita para el efecto de *T. vulgaris*, colocando las siguientes cantidades de los monoterpenos en los discos de papel filtro: 0.45 a 9 mg de timol y de carvacrol de manera independiente, y una mezcla de ambos (1:1) de 0.46 mg a 4.6 mg de cada monoterpeno (v/v), usando como control al disolvente dimetil sulfoxido (DMSO) en cantidades de 11 mg/disco. Finalmente las tres placas se llevaron a incubar a 37 °C por 24 horas.

8.5 Prueba de susceptibilidad a antibióticos de la cepa de referencia de *E. coli* uropatógena

Se realizó una siembra en césped en una placa de agar soya tripticaseína, con la cepa de *E. coli* uropatógena precultivada a 37 °C por 24 horas ($Ab_{560nm} = 1$). En la base del agar sembrado, fueron colocados de manera equidistante, sensidiscos de 5 mm de diámetro contenidos con los siguientes antibióticos: nitrofurantoina (Nf, 300µg), tetraciclina (Te, 30 µg), bacitracina (B, 10 µg), cloranfenicol (Cl, 30 µg), oxacilina (Ox, 1 µg), furazolidona (Fr, 100 µg), ertapenem (ETP, 10 µg), eritromicina (E, 15 µg), amikacina (Ak, 30 µg) y ciprofloxacina (CIP, 5 µg). Posteriormente la placa se llevó a incubar a 37 °C por 24 horas. Terminado el tiempo de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición formados.

8.6 Determinación del efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* sobre una cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena

Se realizaron ensayos utilizando la técnica de difusión en agar, colocando discos de papel filtro estériles (diámetro aproximado de 5 mm) en la superficie de una placa de agar soya tripticaseína, previamente sembrada en césped con la cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena incubada a 37 °C por 24 horas ($Ab_{560nm} = 1$). Luego, en cada disco de papel se

colocaron diferentes cantidades del aceite esencial: 1.2 mg a 12 mg. Posteriormente las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas. Al término del tiempo se midieron los halos de inhibición del crecimiento.

8.7 Determinación del efecto de timol y carvacrol en el crecimiento de una cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena

Para determinar el efecto de los monoterpenos timol y carvacrol en el crecimiento de la cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena, se realizó la misma metodología para el efecto de los monoterpenos anteriormente mencionada.

8.8 Prueba de susceptibilidad a antibióticos de una cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena.

Para medir el perfil de susceptibilidad a los antibióticos de la cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena, se realizó la misma metodología anteriormente mencionada para la cepa de referencia.

8.9 Determinación de la actividad respiratoria en *E. coli* uropatógena y efecto del aceite esencial de *T. vulgaris*

La actividad respiratoria se midió polarográficamente con un electrodo de oxígeno. La mezcla de reacción a usar (volumen final= 6 mL) contenía solución amortiguadora Tris HCl 50 mM pH 7 (4.6 ml) y células completas de *E. coli* uropatógena ($Ab_{560nm}=2 - 4$). Las reacciones se iniciaron usando como donadores de electrones a la glucosa (40 mM), y succinato (40 mM). Posteriormente se registró el consumo de oxígeno por minuto. La temperatura se mantuvo constante a 37°C. El efecto de *T. vulgaris* sobre la actividad respiratoria de *E. coli* uropatógena se determinó usando las siguientes cantidades del aceite esencial: 0.65 y 1.3 mg. En todas las pruebas, la actividad respiratoria de *E. coli* uropatógena se reportó por el consumo de $O_2 \text{ min}^{-1} Ab_{560nm}^{-1}$. Los análisis se realizaron por duplicado.

8.10 Análisis espectral de los citocromos de *E. coli* uropatógena y efecto del aceite esencial de *T. vulgaris*

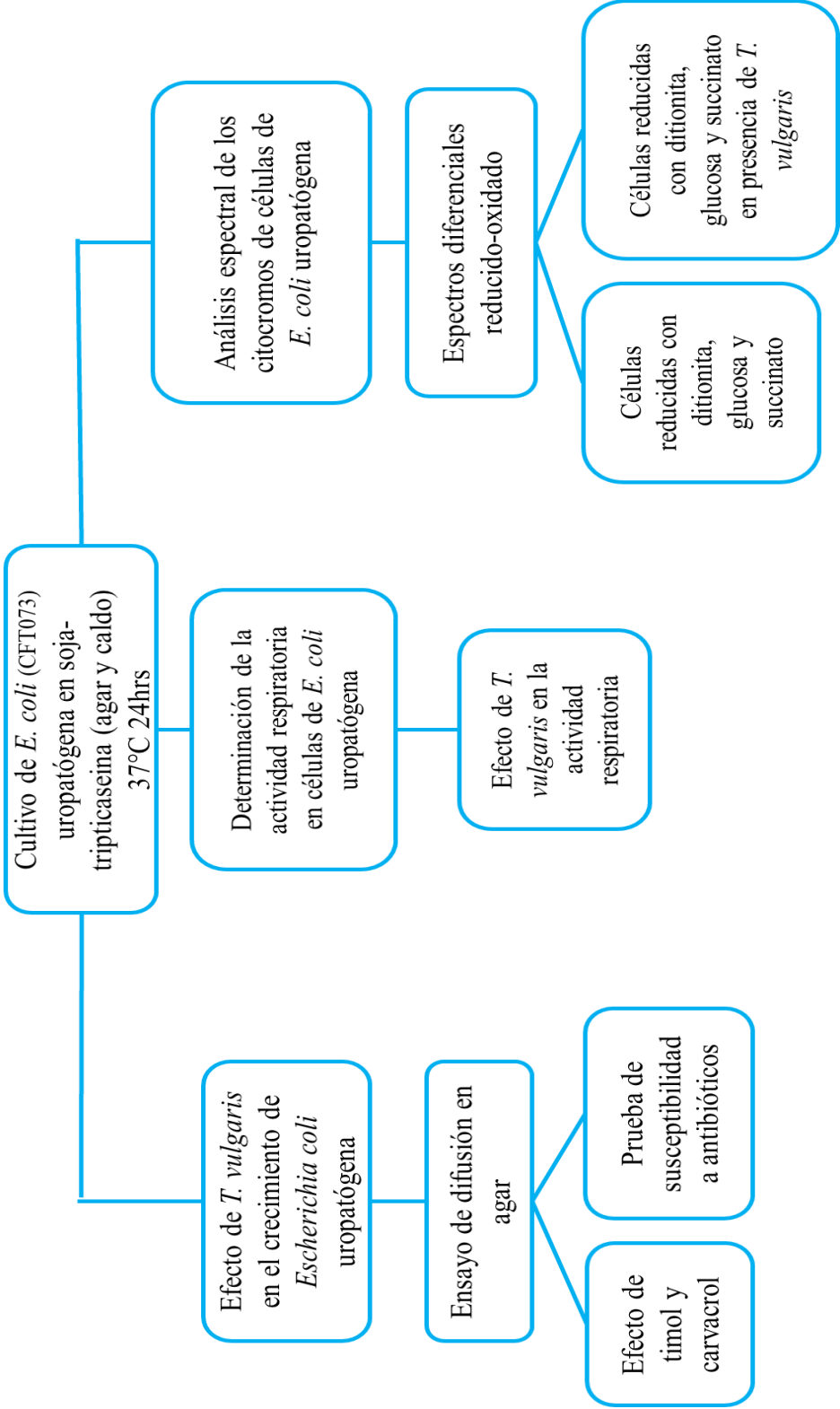
A partir de un precultivo de *E. coli* uropatógena incubado a 37°C por 24 hrs ($A_{560nm}=1$), se realizó un cultivo de *E. coli* uropatógena en un matraz Erlenmeyer de 125 mL contenido con 50 mL de caldo soya tripticaseína. La bacteria se incubó a 37 °C por 24 horas en condiciones estacionarias. Al terminar el tiempo, se recuperó el paquete celular centrifugando a 8,000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. El paquete celular fue lavado dos veces con 4 mL de solución amortiguadora Tris HCl 50mM pH 7. Luego las células de *E. coli* uropatógena fueron resuspendidas en 4 mL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7 conteniendo glicerol al 30%. Los espectros reducido-oxidado fueron preparados oxidando 1 mL de la suspensión celular con persulfato de amonio y reduciendo 1 mL de otra muestra de suspensión celular con glucosa (80 mM) y succinato (80 mM), de manera independiente. La suspensión celular fue incubada durante 30 min a temperatura ambiente y después 30 minutos a temperatura de congelación (-13°C). Posteriormente, se realizó la señal espectral haciendo un barrido de 400 a 700 nm. Siguiendo la misma metodología, para obtener los espectros reducido-oxidado, se determinará el efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* adicionando 5 y 10 µL del aceite esencial a 1 mL de suspensión celular, se dejará incubar 20 min a temperatura ambiente y luego las muestras serán reducidas 30 min a temperatura ambiente con glucosa y succinato a las concentraciones antes citadas y posteriormente congeladas por 30 minutos. La señal espectral será registrada haciendo un barrido de 400 a 700 nm.

8.11 Análisis espectral de células de *E. coli* uropatógena irradiadas con luz ultravioleta

A partir de aproximadamente 1 gr de células de *E. coli* uropatógena se preparo una suspensión celular usando 5 mL de solución amortiguadora Tris HCl 50 mM pH 7 que fue colocada en una caja de petri de 50 mm de diámetro. La suspensión será agitada constantemente usando una bala magnética. La preparación se mantuvo en frío (por medio de un baño de hielo) y fue irradiada con una lampara de lus ultravioleta de onda corta durante 90 minutos.

Culminada la irradiación, la suspensión celular fue centrifugada a 8000 rpm durante 10 min en frío. El paquete celular se resuspendió en 3 ml de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7 conteniendo glicerol como se indicó anteriormente para la realización de espectros reducido-oxidado.

8.12 Esquema general de trabajo



Resultados

9.1 Efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* sobre el crecimiento de la cepa de referencia de *E. coli* uropatógena

Para conocer el efecto del aceite esencial de *T. vulgaris*, se realizó el cultivo de *E. coli* uropatógena, en placas de agar soya-tripticaseína. Se partió de un precultivo de 24 horas incubado a 37 °C con una $Ab_{560nm} = 1.106$. Posteriormente se colocaron discos de papel, y se agregaron diferentes cantidades del aceite esencial: 1.2 – 12 mg. Las placas fueron incubadas a 37° C por 24 horas y se observó la formación de halos de inhibición del crecimiento bacteriano. Los resultados se muestran en la **Figura 2**. Como se observa en la **Figura 2A**, el aceite esencial de *T. vulgaris* produjo un fuerte efecto inhibitorio en el crecimiento de *E. coli* uropatógena. No se observó el crecimiento de ninguna colonia de *E. coli*. Como puede apreciarse en esa figura, la superficie del agar soya-tripticaseína fue completamente lisa sin crecimiento bacteriano a todas las cantidades del aceite esencial ensayado.

De acuerdo al resultado obtenido y para saber si el efecto observado era bactericida o bacteriostático, se realizó una resiembra en una placa de agar soya-tripticaseína fresca, partiendo de los sitios donde no se observó crecimiento de la bacteria en la primera placa. Esta última placa fue incubada a 37 °C durante 24 horas. Los resultados se muestran en la **Figura 2B**. Como se pudo apreciar, el aceite esencial de *T. vulgaris* tuvo una acción bactericida ya que anuló el crecimiento en su totalidad, no permitiendo la recuperación de bacterias a partir de la primera placa.

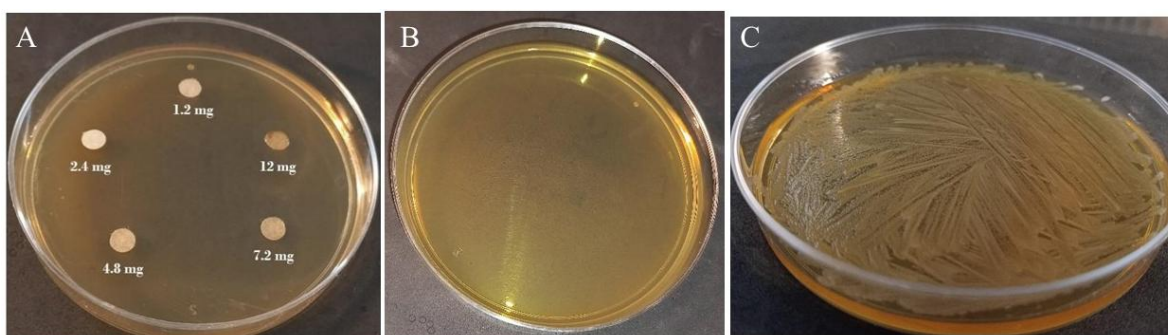


Figura 2. Efecto del aceite esencial de *T. vulgaris*. A. Crecimiento de *E. coli* uropatógena en presencia de diferentes cantidades del aceite esencial de *T. vulgaris*. B. Efecto bactericida del aceite esencial de *T. vulgaris*. C. Condición control en agar soya-tripticaseína.

9.2 Efecto de timol y carvacrol en el crecimiento de la cepa de referencia de *E. coli* uropatógena

Para tener una referencia en relación a la inhibición del crecimiento de *E. coli* uropatógena, se probaron dos monoterpenos de los cuales se ha descrito que están presentes en el aceite esencial de *T. vulgaris*. Los monoterpenos ensayados fueron timol y carvacrol. Para ello, se realizó el cultivo de la bacteria en placas de agar soya-tripticaseína y se colocaron discos de papel impregnados con las siguientes cantidades de los monoterpenos: timol (0.45 – 9.0 mg) y carvacrol (0.45 – 9.0 mg). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas. Los resultados se muestran en la **Figura 3A y 3B**. Como se muestra en las **Figuras 3A y 3B**, el efecto tanto de timol como de carvacrol, fue bactericida ante la presencia de *E. coli* uropatógena esto debido a que no hubo crecimiento de la bacteria al estar presentes los monoterpenos. Como se mencionó anteriormente, ambos monoterpenos componen al aceite esencial como una sola mezcla, es por ello que como referencia se probó el efecto sinérgico de timol y carvacrol en placas de agar soya-tritricaseína sembradas con *E. coli* uropatógena. Las cantidades fueron ajustadas de tal forma que se alcanzaran los valores ensayados en las **Figuras 3A y 3B** (m/m = 1:1). Los resultados se muestran en la **Figura 3C**. Como se puede observar el efecto sinérgico de los monoterpenos resultó bactericida, ya que inhibió el crecimiento de *E. coli* uropatógena alrededor de los discos impregnados.

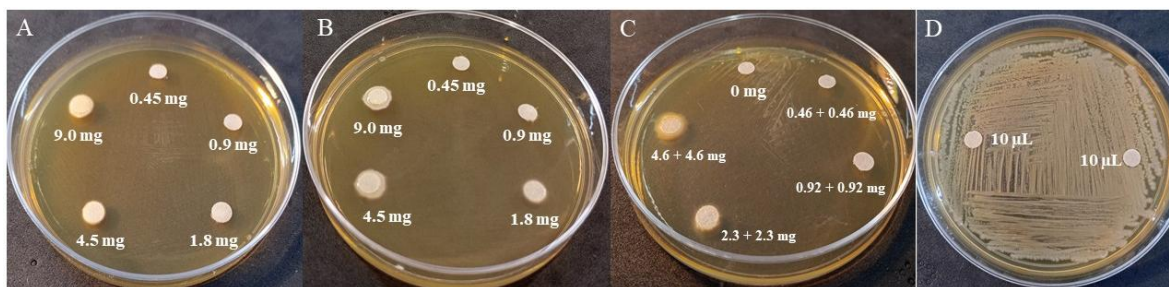


Figura 3. Efecto de timol y carvacrol en el crecimiento de *E. coli* uropatógena. A. Timol. B. Carvacrol. C. Mezcla de timol/carvacrol (1:1). D. Condición control: Como timol fue disuelto en DMSO, se agregaron 11 mg/disco de DMSO al cultivo control.

9.3 Perfil de susceptibilidad a antibióticos de la cepa de referencia de *E.coli* uropatógena

Como se mencionó previamente, *E. coli* uropatógena es considerada una bacteria multiresistente a los antibióticos, limitando así el tratamiento y complicando las infecciones. Es por ello que así como se evaluó el comportamiento de *E. coli* uropatógena en presencia del aceite esencial de *T. vulgaris* y los dos monoterpenos; también se evaluó y comparó el comportamiento de la bacteria ante diferentes antibióticos.

Para conocer el perfil de sensibilidad/resistencia de *E. coli* uropatógena ante la presencia de diferentes antibióticos, se realizaron las siembras correspondientes de la bacteria en placas de agar soya-tripticaséina tomada de un precultivo de 24 horas, incubado a 37° C. Posteriormente se colocaron sensidiscos en la superficie del agar, como fue indicado en la sección de Materiales y métodos. Las placas se llevaron a incubar por 24 horas a 37 °C y se observó la formación de halos de inhibición del crecimiento en la placa.

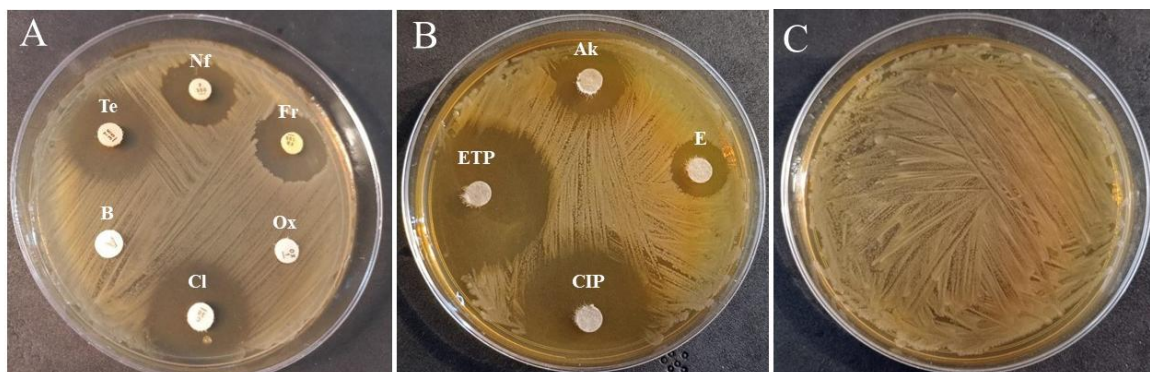


Figura 4. Perfil de sensibilidad de *E. coli* uropatógena a diferentes antibióticos. A. Crecimiento de *E. coli* uropatógena en presencia de nitrofurantoina (Nf), furazolidona (Fr), oxacilina (Ox), cloranfenicol (Cl), bacitracina (B) y tetraciclina (Te); B. Crecimiento de *E. coli* uropatógena en presencia de amikacina (Ak), eritromicina (E), ciprofloxacino (CIP) y ertapenem (ETP); C. Condición control en agar soya-tripticaséina.

Como se muestra en las **Figuras 4A y 4B**, hubo la formación de halos de inhibición en el crecimiento de *E. coli* uropatógena en algunos de los antibióticos ensayados. Posteriormente

se midió el diámetro de estos halos de inhibición para poder determinar el perfil de sensibilidad/ resistencia de estos antibióticos, así como lo muestra **la Tabla 3**.

Como se aprecia en la **Tabla 3** la cepa de *E. coli* uropatógena resultó ser sensible a los antibióticos ensayados: amikacina, ciprofloxacino, cloranfenicol, ertapenem, furazolidona, nitrofurantoina y tetraciclina, registrándose halos de inhibición cuyos diámetros fueron de 20 a 39 mm. En el caso de la eritromicina, la bacteria resulto con un grado de sensibilidad intermedio, registrando un diámetro del halo de inhibición de 15 mm; y, por último, *E. coli* uropatógena resulto ser resistente a dos antibióticos: bacitracina y oxacilina.

Tabla 3. Sensibilidad de *E. coli* uropatógena a diferentes antibióticos

Antibióticos	Inhibición del crecimiento (mm)	Sensibilidad	Desviación estándar (mm)
Ak (30 µg)	19	S	0.57
CIP (5 µg)	34	S	0.57
Cl (30 µg)	24	S	0.5
ETP (10 µg)	39	S	0.57
Fr (100 µg)	22	S	0.5
Nf (300 µg)	20	S	0
Te (30 µg)	23	S	0.5
E (15 µg)	15	I	0.57
B (10 µg)	Con crecimiento	R	nd
Ox (1 µg)	Con crecimiento	R	nd

S- Sensible; R- Resistente; I- Intermedio; nd- No determinado.

9.4 Efecto bactericida del aceite esencial de *T. vulgaris* sobre una cepa de aislamiento clínico de *Escherichia coli* uropatógena

Una vez conocido el comportamiento de la cepa de referencia de *E. coli* uropatógena utilizada en los tres ensayos previamente mencionados, estos mismos también se realizaron en una cepa de *E. coli* uropatógena de aislamiento clínico de infección de vías urinarias; con el objetivo de comparar el perfil de sensibilidad/resistencia de los antibióticos, así como también, evaluar el efecto tanto del aceite esencial de *T. vulgaris* y de los monoterpenos timol y carvacrol ante esta nueva cepa.

Para conocer el efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* ante la presencia de la cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena, se realizó el cultivo de *E. coli* uropatógena, en placas de agar soya-tripticaseína, partiendo de un precultivo de 24 horas incubado a 37 °C. Posteriormente, se colocaron discos de papel, impregnados con diferentes cantidades del aceite esencial: 1.2 – 12 mg. Las placas fueron incubadas a 37° C por 24 horas y se observó la formación de halos de inhibición del crecimiento bacteriano. Los resultados se muestran en la **Figura 5**.

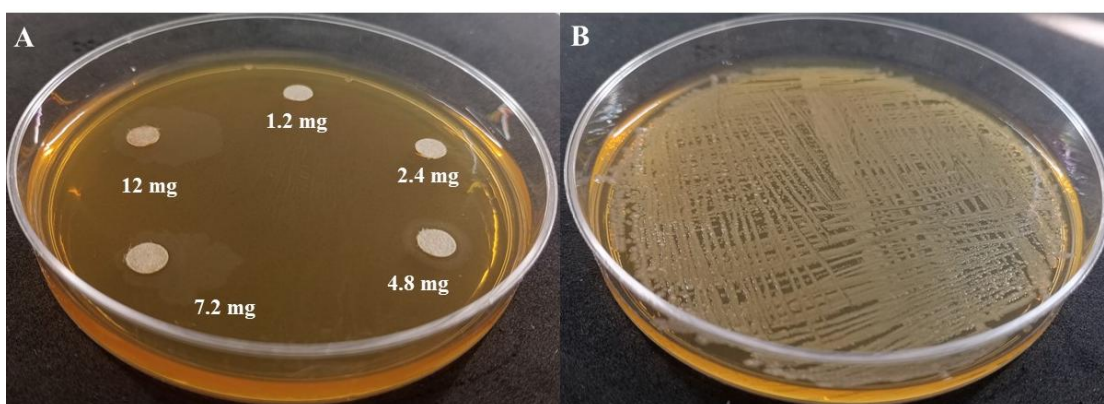


Figura 5. Efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* en una cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena. A. Efecto bactericida del aceite esencial de *T. vulgaris*; B. Condición control.

Como se muestra en la **Figura 5**, el aceite esencial de *T. vulgaris* resultó ser un compuesto bactericida sobre la cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena, ya que ante la presencia del aceite esencial su crecimiento fue inhibido en su totalidad.

9.5 Efecto de timol y carvacrol en el crecimiento de una cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena

Para conocer el efecto de los monoterpenos timol y carvacrol en el crecimiento de una cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena, se realizó el cultivo de la bacteria en placas de agar soya-tripticaseína y se colocaron discos de papel impregnados con las siguientes cantidades de los monoterpenos: timol (0.45 – 9.0 mg) y carvacrol (0.45 – 9.0 mg). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas. Los resultados se muestran en la **Figura 6**.

En la **Figura 6A** se observa que al colocar la cantidad más pequeña (0.45 mg) del monoterpeno timol, hubo poco crecimiento de la bacteria, mientras que, en las demás cantidades, el crecimiento se inhibió en su totalidad. Por otro lado, en la **Figura 6B**, se puede observar que el monoterpeno carvacrol inhibió en su totalidad el crecimiento de la cepa de aislamiento clínico de la bacteria. Por otra parte, el efecto sinérgico de los monoterpenos timol y carvacrol (m/m = 1:1) sobre el crecimiento de la cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena, representado por la **Figura 6C**, resultó en un efecto bactericida, ya que el crecimiento de la bacteria se inhibió en su totalidad.

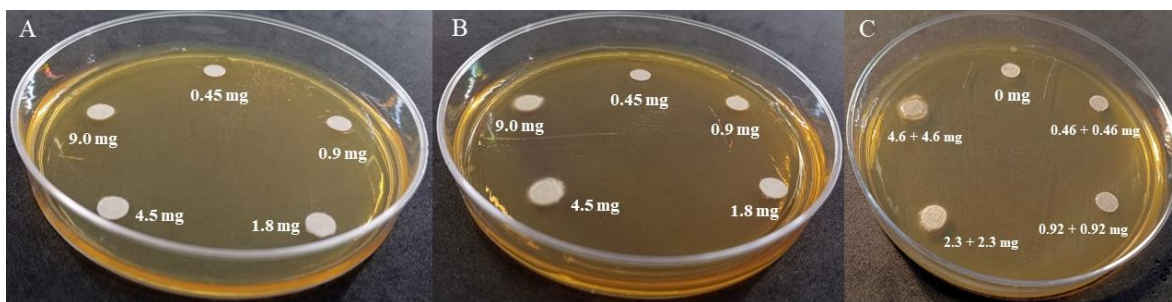


Figura 6. Efecto de timol y carvacrol en el crecimiento de una cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena. A. Timol; B. Carvacrol; C. Mezcla de carvacrol/timol 1:1.

9.6 Perfil de sensibilidad o resistencia de cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena a diferentes antibióticos

Para conocer el perfil de sensibilidad/resistencia de la cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena ante la presencia de diferentes antibióticos, se realizaron las siembras correspondientes de la bacteria en placas de agar soja-tripticaseína, incubadas a 37 °C por 24 horas y sometidas a la presencia de los antibióticos anteriormente mencionados en el apartado de Materiales y métodos. Finalmente se analizó la formación de halos de inhibición en la placa y se tomaron las medidas de estos halos para ver el grado de sensibilidad/resistencia de la bacteria ante los antibióticos ensayados. Los resultados se muestran en la **Figura 7**.

Como se muestra en las **Figuras 7A y 7B**, hubo la formación de halos de inhibición en el crecimiento de la cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena en algunos de los antibióticos ensayados. Posteriormente se midió el diámetro de estos halos de inhibición para poder determinar el perfil de sensibilidad/resistencia de estos antibióticos, así como lo muestra la **Tabla 4**, en donde se observa que la cepa resultó sensible a los antibióticos: amikacina, ciprofloxacino, cloranfenicol, eritromicina, ertapenem, furazolidona y nitrofurantoina; registrándose halos de inhibición con diámetros de 15 a 34 milímetros. Mientras que la cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena resultó ser resistente a tres antibióticos: bacitracina, oxacilina y tetraciclina.

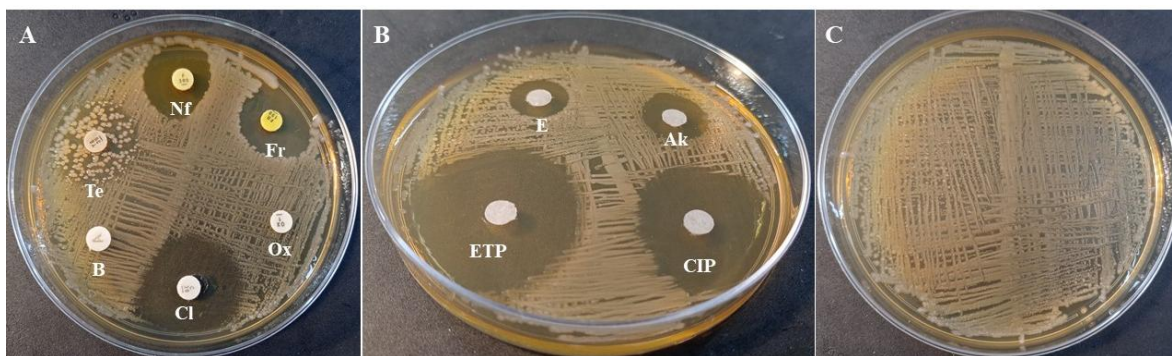


Figura 7. Perfil de sensibilidad de la cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena a diferentes antibióticos. A. Crecimiento de la cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena en presencia de nitrofurantoina (Nf), furazolidona (Fr), oxacilina (Ox), cloranfenicol (Cl), bacitracina (B) y tetraciclina (Te); B. Crecimiento de la cepa de

aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena en presencia de amikacina (Ak), eritromicina (E), ciprofloxacino (CIP) y ertapenem (ETP); C. Condición control en agar soya-tripticaseína.

Tabla 4. Sensibilidad de la cepa de aislamiento clínico de *E. coli* uropatógena a diferentes antibióticos

Sustancia	Inhibición del crecimiento (mm)	Sensibilidad	Desviación estándar (mm)
Ak (30 µg)	15	S	0
CIP (5 µg)	29	S	0.70
Cl (30 µg)	28	S	0
E (15 µg)	15	S	0
ETP (10 µg)	34	S	0
Fr (100 µg)	24	S	0.70
Nf (300 µg)	21	S	0.70
B (10 µg)	Con crecimiento	R	-
Ox (1 µg)	Con crecimiento	R	-
Te (30 µg)	Con crecimiento	R	-

S- Sensible; R- Resistente; I- Intermedio.

9.7 Actividad respiratoria y efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* en *E. coli* uropatógena

Las tasas de respiración de *E. coli* uropatógena y el efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* fueron determinadas a través del consumo de oxígeno disuelto. Para eso se empleó un electrodo de Clark y se usó a succinato y glucosa como sustratos siguiendo la metodología descrita en la sección correspondiente. Los resultados se muestran en la **Figura 8**. En la **Figura 8A**, se muestran las cinéticas de la actividad respiratoria de succinato oxidasa, en ausencia y presencia del aceite esencial de *T. vulgaris*. La actividad respiratoria de las células de *E. coli* uropatógena se registró en 22.68 nmol O₂ min⁻¹ (correspondiente al segmento indicado entre las flechas). Al aplicar 0.65 mg y 1.3 mg de *T. vulgaris*, la actividad respiratoria (succinato oxidasa) decayó completamente, indicando un efecto fuertemente inhibitorio del aceite esencial. En la **Figura 8B**, se muestra la cinética de la actividad

respiratoria de glucosa oxidasa de *E. coli* uropatógena, en presencia y ausencia de *T. vulgaris*. En este caso la actividad respiratoria mostró un valor de $21.75 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1}$ (para el segmento ubicado entre las flechas). En presencia de *T. vulgaris* la actividad respiratoria decayó como en el caso anterior. También aquí se pudo concluir que el aceite esencial inhibió completamente la actividad respiratoria.

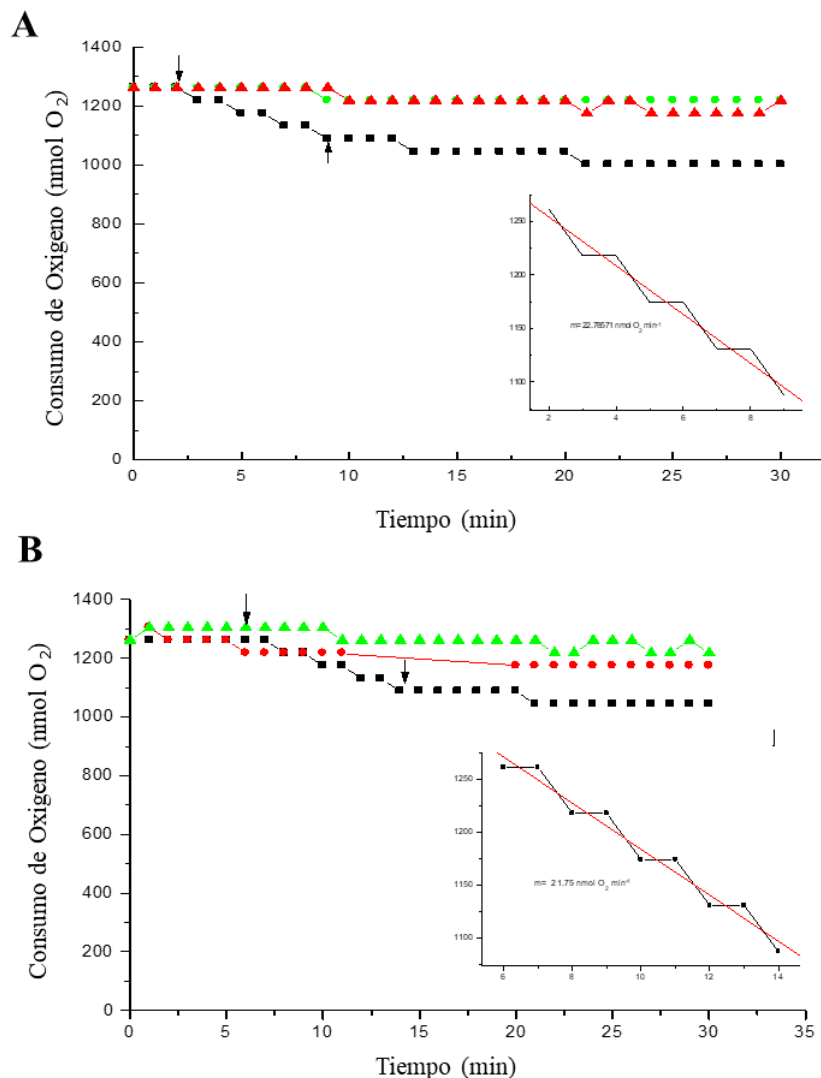


Figura 8. Actividades respiratorias de *E. coli* uropatógena. A. Succinato oxidasa (—■— sin *T. vulgaris*; —▲— 0.65 mg *T. vulgaris*; —●— 1.3 mg *T. vulgaris*). B. Glucosa oxidasa oxidasa (—■— sin *T. vulgaris*; —●— 0.65 mg *T. vulgaris*; —▲— 1.3 mg *T. vulgaris*).

9.8 Análisis espectral de células de *E. coli* uropatógena tratadas con aceite esencial de *T. vulgaris* y reducidas con succinato

Como se dijo en materiales y métodos, los espectros reducido-oxidado fueron realizados a partir de 250 mg de células de *E. coli* obtenidas de un precultivo de 50 ml incubado a 37 °C, durante 24 horas en condiciones estacionarias y lavadas previamente con solución amortiguadora Tris HCl 50 mM pH 7. Dichas células fueron oxidadas con persulfato (1 mg) y reducidas con succinato (66 mM). Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 min y luego congeladas a -13 °C durante 30 min. Para determinar el efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* en la reducción de citocromos de *E. coli* uropatógena, las células fueron incubadas con el aceite esencial de *T. vulgaris* (6.5 y 13 mg) durante 20 min a temperatura ambiente. Luego las células fueron oxidadas y reducidas como se describió previamente. Posteriormente, se realizaron los barridos espectrales de 400-700 nm de cada una de las muestras y se registraron los cambios de absorbancia. En la **Figura 9** se muestra el espectro reducido-oxidado usando como donador de electrones al succinato. Como se puede observar se logró la reducción de los citocromos de tipo *b*, en la región Soret o γ , absorbiendo a 420 y 430 nm. Esto mismo se observó en la región β con las bandas que aparecen a 530 y 560 nm. En la región α fue muy notoria una banda ancha cuyo máximo se apreció al rededor de los 644 nm (correspondiente a la presencia de un citocromo de tipo *d*) (**Figura 9a**). Esto último nos indicó la presencia de la oxidasa terminal *bd* en células de *E. coli* uropatógena. En la **Figura 9b** se muestra el espectro reducido-oxidado de células de *E. coli* uropatógena incubadas en presencia de 6.5 mg de *T. vulgaris*. Como se puede apreciar, se logró la reducción de los citocromos de tipo *b* a 420 y 430 nm como en el caso anterior, lo mismo en la región β a 530 y a 560 nm. Sin embargo en la región α la reducción del citocromo *d* fue mucho menor comparada con la reducción observada en ausencia de *T. vulgaris*. En la **Figura 9c** se observa una falta de reducción del citocromo *d* en la región α después de haber incubado a las células de *E. coli* uropatógena en presencia de 13 mg de *T. vulgaris*. Por lo tanto y de acuerdo a los resultados obtenidos, el aceite esencial de *T. vulgaris* produjo una disminución en la reducción de la oxidasa terminal de *E. coli* uropatógena. En

el caso de los citocromos de tipo *b*, tanto de la región Soret como de la región β , no se observó una disminución en su reducción.

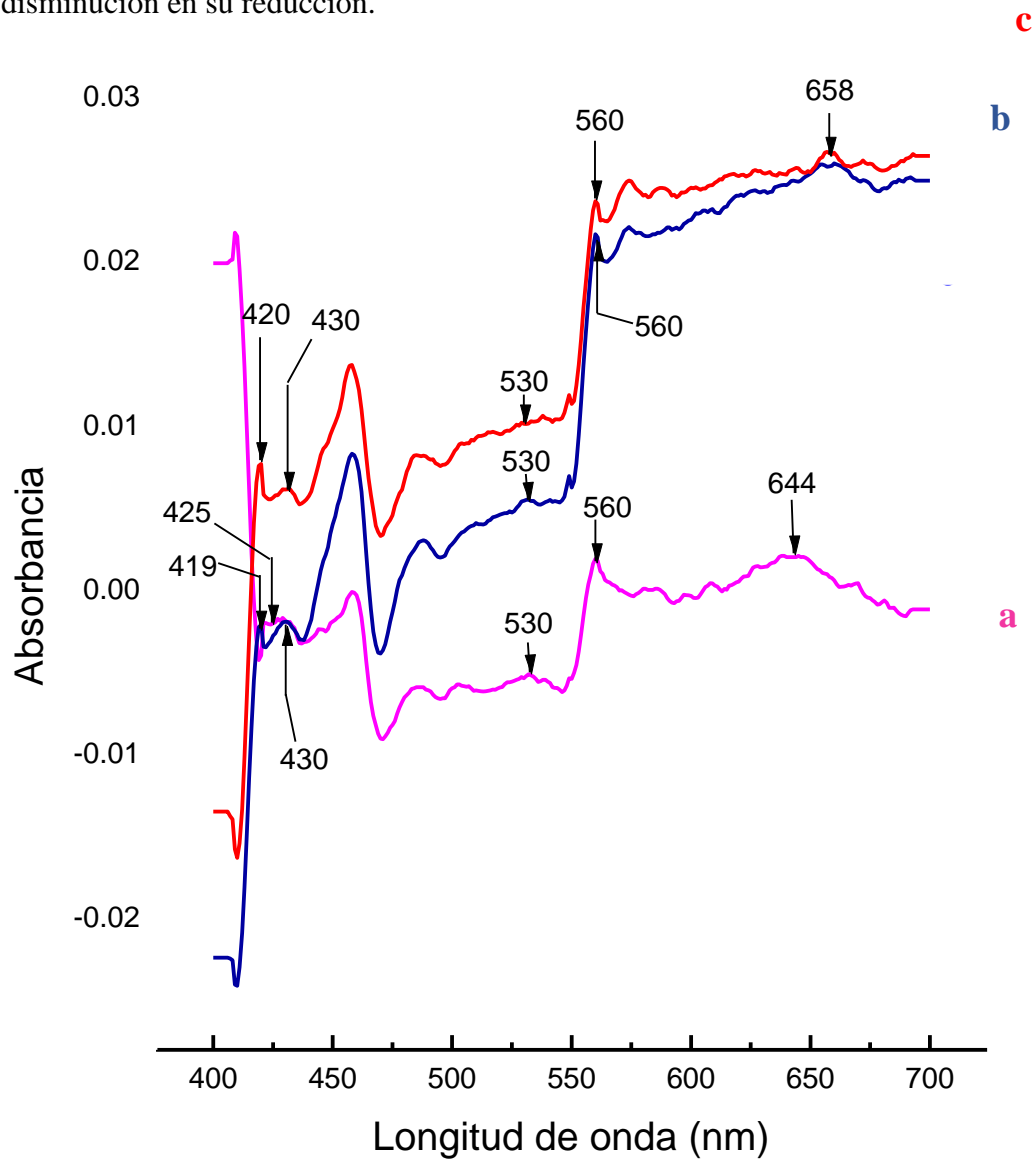


Figura 9. Espectro diferencial reducido-oxidado de células de *E. coli* uropatógena, reducidas con succinato. **a.** Células de *E. coli* uropatógena reducidas con succinato. **b.** Reducción con succinato e incubación con *T. vulgaris* (6.5 mg). **c.** Reducción con succinato e incubación con *T. vulgaris* (13 mg).

9.9 Análisis espectral de células de *E. coli* uropatógena tratadas con aceite esencial de *T. vulgaris* y reducidas con glucosa.

En la **Figura 10**, se muestran los resultados obtenidos de la reducción de citocromos de células de *E. coli* uropatógena cuando se usó glucosa como donador de electrones. Como se muestra en la **Figura 10a**, las células de *E. coli* uropatógena mostraron la reducción de la oxidasa terminal *bd*, como se observa en la banda ancha a 646 nm. En la región β fue notable la reducción de los citocromos de tipo *b* (picos a 535 y 560 nm). Estos últimos deben corresponder a los citocromos de tipo *b* de la oxidasa terminal *bd* y probablemente *bo*. En lo que refiere a la región γ o Soret, se pudo observar que los citocromos de tipo *b* fueron pobremente reducidos. En la **Figura 10b** se muestra el espectro reducido-oxidado de células de *E. coli* uropatógena incubadas con 6.5 mg de *T. vulgaris*. En este caso se logró la reducción de los citocromos de tipo *b*, observándose los picos a 536 y 560 nm; sin embargo, en la región α , la reducción del citocromo *d* fue menor comparada con la reducción observada en ausencia de *T. vulgaris*. Al incubar las células de *E. coli* uropatógena con 13 mg de *T. vulgaris*, se observó que la reducción del citocromo *d* fue mucho menor que en la región α (**Figura 10c**). Los citocromos de tipo *b* se mantuvieron reducidos dando señales espectrales a 420, 430, 530 y 560 nm. A partir de los resultados anteriores se observó que el aceite esencial de *T. vulgaris* produjo una disminución en la reducción del citocromo *d* en las células de *E. coli* uropatógena. Ese resultado nos condujo a proponer que *T. vulgaris* produjo un efecto inhibitorio en la oxidasa terminal *bd* de *E. coli* uropatógena. En el caso de los citocromos de tipo *b* no se observó una disminución en su reducción. Proponemos que tales citocromos pudieran formar parte de otros componentes de la célula de *E. coli* uropatógena, (como pudiera ser la oxidasa terminal *bo*) y que al poseer el grupo hemo *b* se mantienen reducidos por el efecto del succinato. Esos hemos *b* probablemente fueron parte de la otra oxidasa terminal que funciona en *E. coli* cuando crece aeróbicamente (citocromo oxidasa *bo*). Sin embargo, como las células analizadas se obtuvieron bajo condiciones estacionarias, la oxidasa terminal citocrómica preferente es *bd* (condiciones microaerófilas).

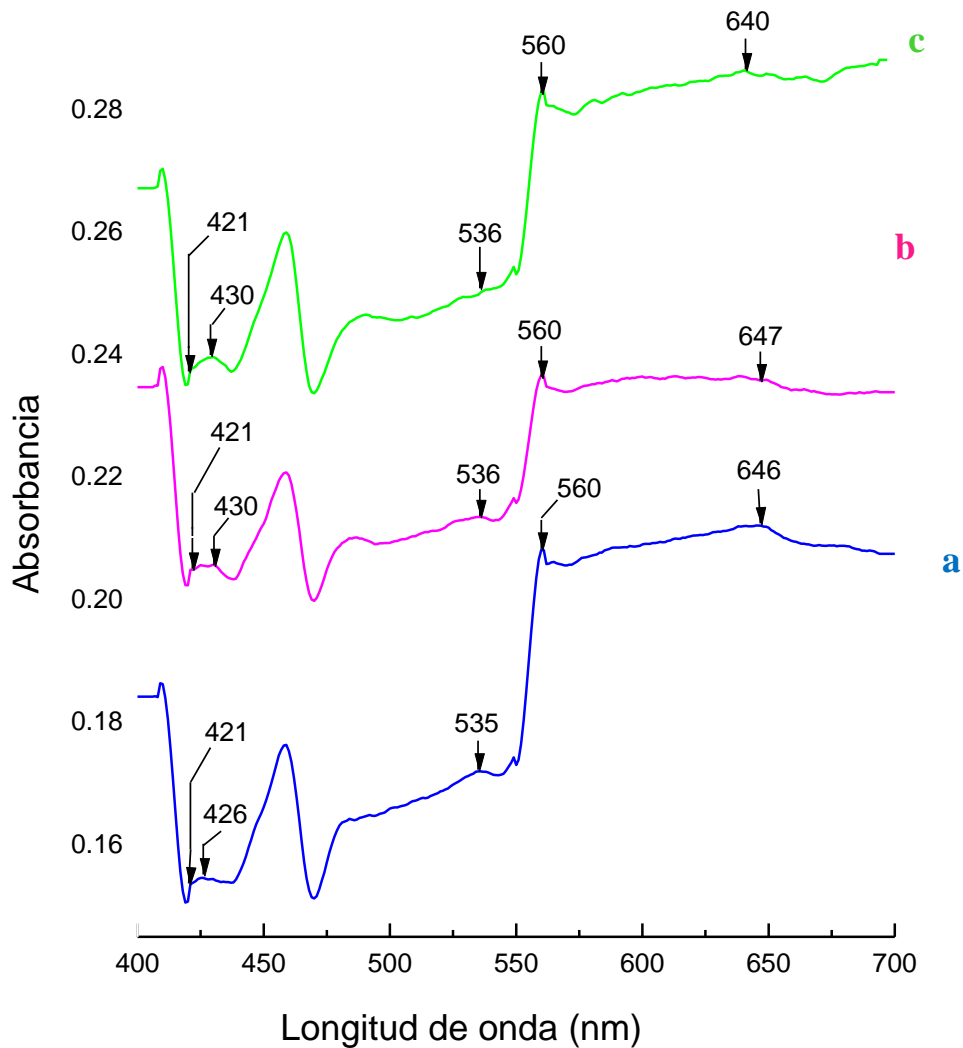


Figura 10. Espectro diferencial reducido-oxidado de células de *E. coli* uropatógena. **a.** Células de *E. coli* uropatógena reducidas con glucosa. **b.** Reducción con glucosa e incubación con *T. vulgaris* (6.5 mg). **c.** Reducción con glucosa e incubación con *T. vulgaris* (13 mg).

9.10 Análisis espectral de células de *E. coli* uropatógena irradiadas con luz ultravioleta

Con la finalidad de producir una disminución importante en la reducción de los citocromos de la oxidasa terminal *bd* de *E. coli* uropatógena, se llevó a cabo la inactivación de la ubiquinona presente en su cadena respiratoria, irradiando las células de *E. coli* con luz

ultravioleta como se describió en la sección de materiales y métodos. En la **Figura 11** se muestran los resultados obtenidos.

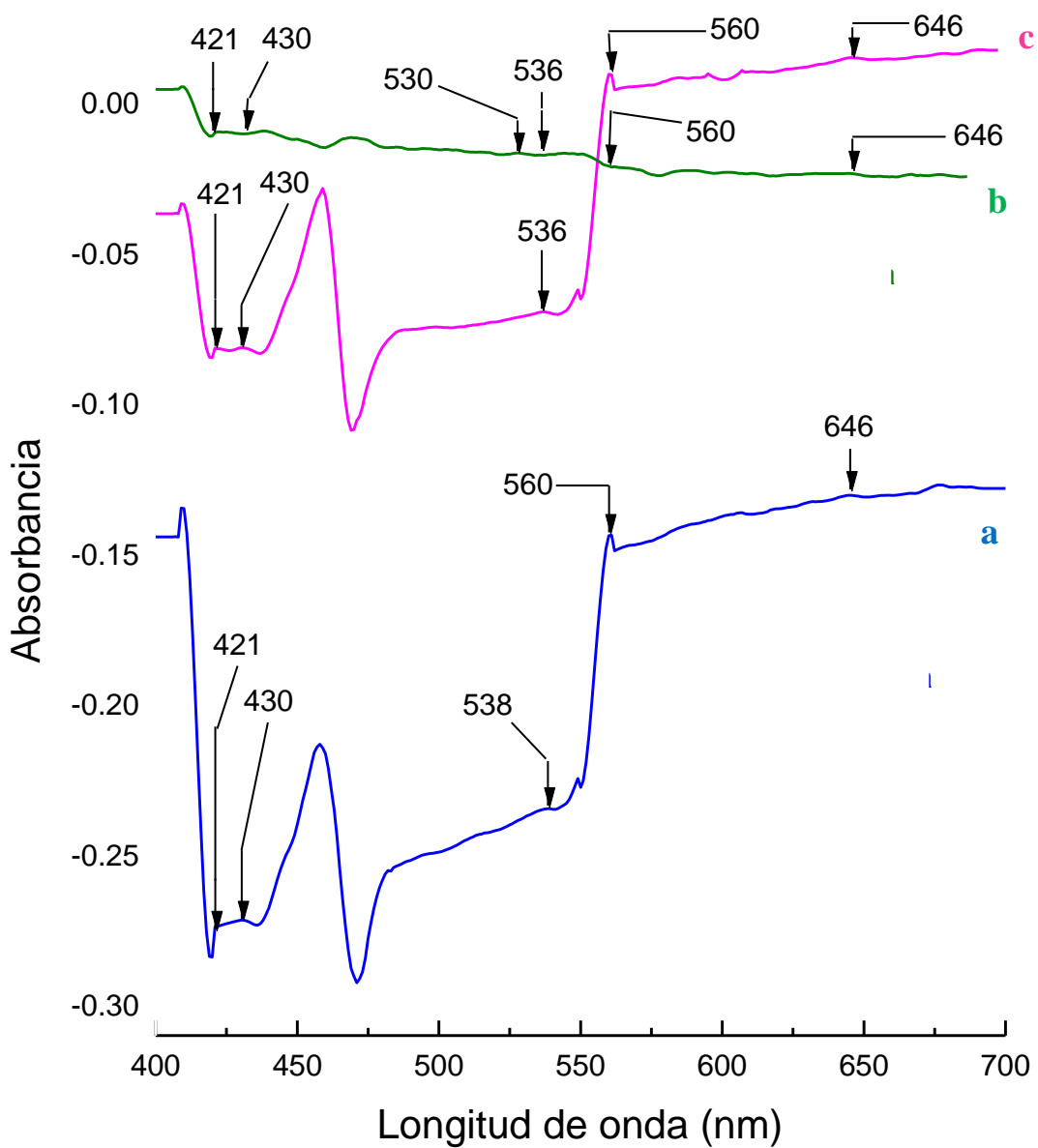


Figura 11. Espectro diferencial reducido-oxidado de células de *E. coli* uropatógena irradiadas con luz UV y reducidas con ditionita (a), glucosa (b) y succinato (c).

Como se puede observar en la **Figura 11a**, no hubo reducción de los citocromos de tipo *b* en la región Soret (a 440 nm). Usando ditionita se observó una baja reducción de los citocromos de tipo *b* y *d* presentes en las células de *E. coli* uropatógena irradiadas (región β y α). Al usar glucosa como reductor, la reducción de los citocromos fue aun menor, como se muestra en la **Figura 11b**, en especial de la banda a 646 nm correspondiente al citocromo *bd*. En la **Figura 11c**, cuando se empleó al succinato como donador de electrones no se observó ninguna reducción de los componentes citocrómicos. A partir de los resultados anteriores, se pudo concluir que la luz ultravioleta inactivó a la ubiquinona del sistema respiratorio de *E. coli* uropatógena y por ello, los niveles de reducción registrados fueron diferentes a los observados en las células de *E. coli* no irradiadas (**Figuras 9 y 10**). Observando una disminución importante en la reducción de los citocromos en las células irradiadas con luz ultravioleta, se propuso que probablemente el aceite esencial de *T. vulgaris* podría estar afectando a la ubiquinona de *E. coli* uropatógena, produciéndose resultados similares (disminución en la reducción de citocromos) cuando las células de *E. coli* son tratadas con este aceite esencial. Por otro lado, al ser la ubiquinona un compuesto altamente hidrofóbico, éste podría interactuar con el aceite esencial de *T. vulgaris* en la membrana citoplasmática produciendo también un bloqueo en el transporte de electrones hacia la oxidasa terminal.

Discusión

Los aceites esenciales son mezclas de un diverso número de metabolitos liposolubles, que han llamado la atención en las últimas décadas por sus numerosas aplicaciones biológicas, entre ellas, sus propiedades antimicrobianas ante bacterias como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*; de igual manera en cepas fúngicas de *Candida albicans* y *Candida famata* (**Borugă et al., 2014; Burt et al., 2014; Ebani et al., 2018**). Como se demostró en el apartado de resultados, al realizar un ensayo de difusión en disco en agar, usando las cantidades 1.2 mg, 2.4 mg, 4.8 mg, 7.2 mg y 12 mg del aceite esencial de *T. vulgaris*, este resultó ser un compuesto bactericida ante la cepa de *E. coli* uropatógena, anulando su crecimiento en su totalidad. En la literatura, otros estudios han expresado resultados comparables a los que obtuvimos con respecto al efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* ante el crecimiento bacteriano; un ejemplo es el trabajo realizado por **Cáceres et al. (2020)** donde de igual manera se demostró que el aceite esencial de *T. vulgaris* es un antimicrobiano efectivo, a través de la realización de un ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) usando un rango de concentraciones de este aceite de 0,37 a 0,75 mg/mL, donde resultó una fuerte inhibición del crecimiento bacteriano en las cepas *E. coli* O157:H7, *E. coli* O33 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Por otro lado, **Mollea et al. (2022)** resaltaron la eficacia antimicrobiana de los aceites esenciales de tomillo y orégano a través de la realización de las pruebas antimicrobianas de difusión en disco y volatilización en disco en cepas de *S. epidermidis* y *E. coli*, en donde ambas bacterias fueron inhibidas por los aceites esenciales de tomillo y orégano cuando se aplicaron puros (100% v/v) y/o diluidos (75% y 50% v/v), observando una mayor inhibición en la prueba de difusión en disco. Además, hacen mención de que la actividad del aceite esencial puede variar según la modalidad de aplicación, es decir, en la fase líquida o en la fase de vapor del aceite esencial; así como también la concentración probada y la susceptibilidad individual de la cepa experimental a dichos compuestos. Otro estudio realizado por **Bastida-Ramírez et al. (2024)** donde se demostró que los aceites esenciales de *Lippia organoides* y de *T. vulgaris* tienen un efecto antibacteriano contra cepas de *E. coli* productoras de Betalactamasas de espectro extendido, a través del método de difusión en disco para las

pruebas de susceptibilidad; así como también pruebas de microdilución para determinar la CMI y la Concentración Mínima Bactericida (CMB); obteniendo como resultado la inhibición del crecimiento en placa, lo cual superó el diámetro de los halos de inhibición de betalactámicos comunes.

En investigaciones previas se ha mencionado la relación que tiene la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales con su composición química, la cual incluye hidrocarburos monoterpénicos, monoterpenos oxigenados, hidrocarburos sesquiterpénicos, sesquiterpenos oxigenados, cetonas, aldehídos, éteres y ésteres (**Dong et al., 2023**). En el estudio realizado por **Mansouri et al. (2018)**, donde se realizó una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), la cual, permitió analizar la composición del aceite esencial de *T. vulgaris*, identificando 14 compuestos, que representaron el 95,58% de todos los constituyentes detectados y se destacó su alto contenido de fenoles que representaron el 74,40%, siendo los principales constituyentes el compuesto Carvacrol (73,03%) que es un potente fenol buscado en los aceites esenciales por su acción antibacteriana y por otro lado el Timol, otro potente fenol que está presente pero en pequeñas cantidades (1,14%). De igual manera mencionaron que el mecanismo de acción de ambos fenoles, cada uno por su lado o en sinergia, implica la disrupción de la membrana celular y el escape del contenido citoplasmático. Mientras que en *E. coli*, el carvacrol y el timol provocan la despolarización y desintegración de la membrana externa, liberando lipopolisacáridos y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática. Así mismo, en los trabajos realizados por **Bastida-Ramírez et al. (2024)** y **Micucci et al. (2020)** mencionan que los monoterpenos timol y el carvacrol exhiben típicamente una actividad antibacteriana ya que, al ser compuestos hidrófobos, pueden interferir con la bicapa lipídica de las membranas citoplasmáticas de las bacterias, provocando pérdida de integridad, aumentando su fluidez y permeabilidad y, en consecuencia, la fuga de material celular como iones. De igual manera en el trabajo realizado por **Ebani et al. (2018b)**, resalta la eficacia del aceite esencial probado en los aislados de *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *C. albicans* y *C. famata* causantes de infecciones del tracto urinario (ITU); mencionando que su alto contenido de timol reportado (52,6%), junto con el carvacrol, le permitieron al aceite esencial ser capaz de bloquear

completamente la síntesis de ergosterol en los valores de CMI realizados, haciendo porosa la membrana y provocando la muerte de las células de levadura de *Candida*. Por otro lado, **Soković et al. (2010)** en su trabajo, evidencian que el aceite esencial de *T. vulgaris*, junto a sus componentes mentol, timol, carvacrol resultaron con mayor actividad antibacteriana probada, así como también, que probablemente el carvacrol interfiere con la actividad de las enzimas de la pared celular como la quitina sintasa/quitinasa y las α - y β -glucanasas de los hongos. Igualmente, resaltan que la alta actividad antimicrobiana de los aceites esenciales podría explicarse por su alto porcentaje de componentes fenólicos y hacen mención, de que los diferentes componentes que conforman a los aceites esenciales pueden tener diferentes modos de acción o que el metabolismo de algunas bacterias es capaz de superar mejor el efecto del aceite o adaptarse a él. Es gracias a estos datos que pudimos corroborar y comparar los resultados obtenidos anteriormente del efecto de los monoterpenos timol y carvacrol, ambos componentes fenólicos del aceite esencial de *T. vulgaris*, ante el crecimiento de *E. coli* uropatógena. Estos compuestos, ya sea en sinergismo o de manera individual, anularon totalmente el crecimiento de la bacteria, demostrando un fuerte efecto bactericida ante el crecimiento de *E. coli* uropatógena.

Se considera que *E. coli* es causante del 80-90% de las infecciones del tracto urinario y, en la actualidad, es una de las infecciones bacterianas más comunes. Además, de que ha llamado la atención la creciente resistencia a diversos antibióticos por parte de esta bacteria, incluidos los nuevos agentes antimicrobianos introducidos en la medicina clínica (**Ebani et al., 2018; Raeispour & Ranjbar, 2018**). En el presente estudio, al realizar las pruebas de susceptibilidad de *E. coli* uropatógena a los antibióticos tanto en la cepa de referencia CFT073 como en la cepa de aislamiento clínico, los resultados obtenidos demostraron que ambas cepas tuvieron un grado de sensibilidad considerable a la mayoría de los antibióticos. De igual manera, ambas coincidieron en presentar resistencia a los antibióticos bacitracina y oxacilina. Cabe resaltar, que la cepa de *E. coli* uropatógena obtenida de un aislamiento clínico registró halos de inhibición con diámetros de 20 a 39 milímetros para los antibióticos sensibles, mientras que para aquellos a los que la cepa resultó ser resistente, es decir el crecimiento de la bacteria continuo sin impedimento, nos hizo suponer que la cepa obtenida previamente de un paciente

con presencia de *E. coli* uropatógena, no estuvo en contacto previo con estos antibióticos o el paciente llevo un tratamiento adecuado y continuo hasta su termino manteniendo así el perfil de sensibilidad ante la presencia de estos antibióticos. **Mouanga Ndzime et al. (2021)** mencionan en su trabajo la elevada frecuencia de resistencia a los antibióticos por parte de *E. coli* uropatógena, ya que sus resultados comprobaron que la cepa de esta bacteria resultó con resistencia a betalactámicos, quinolonas y cotrimoxazol, mientras que Nitrofurantoína, Amikacina, Imipenem y Ertapenem fueron los antibióticos más activos frente a esta bacteria. De igual manera, resaltan que la prevalencia de infecciones tiene una relación con la epidemiología y con la selección de una terapia antibiótica de primera línea, esto nos explica el que los resultados obtenidos al usar una cepa de aislamiento clínico mostraran una diferencia considerable en cuanto al perfil de sensibilidad y resistencia, donde ahora los antibiótico eritromicina y tetraciclina resultaron ser sensible y resistente, respectivamente. Otro estudio realizado por **Rahman et al. (2022)** demostró que los aislamientos de *E. coli* uropatógena utilizados, resultaron ser resistentes a los antibióticos comunes, incluidos algunos de los utilizados para el tratamiento de las infecciones urinarias como la gentamicina, estreptomycin, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamida y eritromicina; además del trimetoprima-sulfametoxazol junto con ciprofloxacino, con una frecuencia variable. Por otro lado, **Kumar et al. (2022)** hace mención de la variabilidad de espectros y tasas de resistencia a antibióticos entre los aislamientos de *E. coli* uropatógena resaltando que los antibióticos amikacina, nitrofurantoína e imipenem son altamente eficaces contra tales cepas. En su estudio al realizar el perfil de resistencia a antibióticos obtuvieron que los betalactámicos (ampicilina, ceftriaxona); fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina) y trimetoprima/sulfametoxazol resultaron con un alto porcentaje de resistencia, mientras que detectaron tasas más bajas de resistencia en piperacilina/tazobactam, carbapenémicos (ertapenem, imipenem); amikacina, nitrofurantoína, cefoperazona/sulbactam y fosfomicina. De igual manera **Blango y Mulvey (2010)**, quienes probaron un panel de 17 antibióticos diferentes con el objetivo de determinar sus efectos sobre la supervivencia del aislado de referencia de *E. coli* uropatógena UTI89 tanto en células uroteliales de la vejiga como en caldo de cultivo, obtuvieron que todos menos uno de los antibióticos probados impidieron el crecimiento de esta cepa en caldo de cultivo, mientras que los antibióticos nitrofurantoína y

las fluoroquinolonas ciprofloxacina y esparfloxacina, fueron capaces de eliminar las bacterias intracelulares en los ensayos basados en cultivos de células de vejiga. Otro trabajo realizado por **Mansouri et al. (2018)** mostró una resistencia total en los antibiogramas realizados en una cepa de *E. coli* aviar usando amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina, ceftazidima (que es una cefalosporina de tercera generación), ácido nalidíxico, danofloxacina, enrofloxacina, tetraciclina y trimetoprima/sulfametoxazol; de igual manera, estas cepas mostraron una resistencia significativa a la colistina, ciprofloxacina y la neomicina; señalando que la cefepima (cefalosporina de cuarta generación), es el único antibiótico para el cual no se ha reportado resistencia a los antimicrobianos.

Como bien es sabido, los anaerobios facultativos como *E. coli* son capaces de crecer tanto en condiciones oxigénicas como anóxicas esto gracias a la complejidad estructural de su cadena respiratoria formada por deshidrogenasas primarias y oxidasas terminales unidas por quinonas, que en conjunto, permiten la formación de un gradiente diferencial de electrones y protones a través de la membrana citoplasmática, conduciendo a la formación de un gradiente electroquímico para la formación de ATP; además de permitirle a la bacteria adaptarse al medio en el que se desarrolla (**Beebout et al., 2021; Price & Driessen; 2010; Wu et al., 2015**). Como ya se ha mencionado previamente, el potente efecto antibacteriano del aceite esencial de *T. vulgaris* ha despertado el interés por estudiar los mecanismos de acción responsables de este efecto. Autores como **Bakó et al. (2023), Dong et al. (2023); López-Ambrocio et al. (2016), O'Bryan et al. (2015) y Swamy et al. (2016)** reportaron que el aceite esencial es capaz de penetrar la membrana lipídica de la bacteria, haciéndola más permeable y provocando la lisis y muerte de esta; de igual manera reportaron que los componentes del *T. vulgaris* son capaces de inhibir distintas rutas bioquímicas y enzimas, brindándoles la capacidad de actuar sobre las proteínas que se encuentran embebidas en la membrana citoplasmática. Sin embargo, hasta ahora no se ha reportado si alguno de estos mecanismos se enfoca en afectar la actividad de la cadena respiratoria de la bacteria. Es por ello que en el presente trabajo se realizaron los ensayos para determinar el efecto del aceite esencial en la actividad respiratoria de *E. coli* uropatógena y en la reducción de citocormos. Los resultados indicaron que el aceite esencial de *T. vulgaris* inhibió la actividad respiratoria

de *E. coli* uropatógena, usando succinato y glucosa como sustratos. Así, se pudo observar que la actividad respiratorio se inhibió completamente. Estos datos sugirieron que *T. vulgaris* es un compuesto efectivo para dañar a la bacteria a nivel de su cadena transportadora de electrones, deteniendo en su totalidad su actividad respiratoria.

Dentro de la cadena respiratoria de *E. coli* se encuentran los citocromos, componentes de vital importancia para el proceso respiratorio de la bacteria, los cuales son hemoproteínas encargadas del transporte fotosintético de electrones durante la respiración tanto anaerobia como aerobia (Thöny-Meyer., 1997). *E. coli* cuenta con distintas oxidasas terminales que catalizan la oxidación ubiquinol para permitir la respiración celular (Cotter *et al.*, 1990). Se sabe que el citocromo *bo*₃ y el citocromo *bd*, transfieren los electrones desde las quinonas reducidas, hasta el aceptor final de electrones (O₂) formando H₂O como producto final (Borisov & Verkhovsky, 2015; Jesse *et al.*, 2013). Bajo condiciones de crecimiento con alta aireación, el citocromo que predomina es el *bo*₃ mientras que en condiciones de microaerofilia, el citocromo *bd* es la reductasa terminal predominante (Borisov *et al.*, 2011^a). En el presente trabajo, se determinó el efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* sobre la actividad de la cadena respiratoria de *E. coli* uropatógena, en especial acerca de la reducción de la citocromo oxidasa. Como se mostró en la sección de Resultados el aceite esencial de *T. vulgaris* produjo una disminución en la reducción del citocromo *d* presente en las células de *E. coli* uropatógena. Ese resultado condujo a proponer que *T. vulgaris* produjo un efecto inhibitorio en la reducción de la oxidasa terminal *bd* de *E. coli* uropatógena. En el caso de los citocromos de tipo *b* no se observó una disminución en su reducción. Proponemos que tales citocromos pudieran formar parte de otros componentes de la célula de *E. coli* uropatógena, (como pudiera ser la oxidasa terminal *bo* y/o algún hemo *b* presente en alguna enzima como la catalasa) y que al poseer el grupo hemo *b* se mantienen reducidos por el efecto del succinato y la glucosa. Esos hemos *b* probablemente fueron parte de la otra oxidasa terminal que funciona en *E. coli* cuando crece aeróbicamente (citocromo oxidasa *bo*). Sin embargo, como las células analizadas se obtuvieron bajo condiciones estacionarias, la oxidada terminal citocrómica preferente es *bd* (condiciones microaerofílicas). Hoy día no se han realizado trabajos previos acerca de la actividad citocrómica en la cadena respiratoria de

E. coli uropatógena; tampoco hay trabajos de referencia que hablen acerca de la actividad del aceite esencial de *T. vulgaris* en estos componentes respiratorios.

Otros componentes de vital importancia en la cadena respiratoria de *E. coli* uropatógena son las ubiquinonas, las cuales se sintetizan en organismos aeróbicos y son componentes redox esenciales de la cadena respiratoria de bacterias y de las mitocondrias de organismos superiores. Además del transporte de electrones, estas residen en todas las membranas celulares de las cuales la forma reducida de la coenzima Q (ubiquinol), sirve como un poderoso antioxidante para prevenir el daño peroxidativo a los lípidos de membrana (**Dunlap et al., 2002**). En el presente trabajo, al exponer las células de *E. coli* uropatógena a la luz ultravioleta, esta inactivó a la ubiquinona del sistema respiratorio de *E. coli* uropatógena observando una disminución importante en la reducción de los citocromos en las células irradiadas. Esto nos llevó a proponer que probablemente el aceite esencial de *T. vulgaris* podría estar afectando a la ubiquinona de *E. coli* uropatógena, produciéndose resultados similares (disminución en la reducción de citocromos) cuando las células de *E. coli* son tratadas con este aceite esencial. Por otro lado, al ser la ubiquinona un compuesto altamente hidrofóbico, éste podría interactuar con el aceite esencial de *T. vulgaris* en la membrana citoplasmática produciendo también un bloqueo en el transporte de electrones hacia la oxidasa terminal. Los trabajos realizados por **Podda et al. (1998)** y **Adair (1968)**, hacen mención de que la ubiquinona desempeña un papel importante en el metabolismo oxidativo en células completas de *E. coli*; es por ello que al exponerse a la luz UV, esta provoca una fotoinactivación de la ubiquinona inhibiendo tanto la fosforilación como la oxidación, dando como resultado un daño oxidativo y con este una pérdida de quinonas; la cual, a su vez, conlleva a una inhibición del crecimiento de la bacteria. Por otro lado, **Kvam & Benner (2020)**, en su trabajo, observaron que a luz azul visible (>400 nm) fotoexcita las moléculas de porfirina en las células, lo que lleva a eventos de transferencia de energía dependientes del oxígeno que producen radicales libres tóxicos. De igual manera resaltan que las menaquinonas son una fuente sustancial de radicales libres superóxido durante la respiración celular y pueden donar electrones accidentalmente directamente al oxígeno molecular a través de potenciales redox favorables. **Kashket & Brodie (1962b)**, de igual forma, dictan

que, las *E. coli* tratadas con radiación UV son incapaces de metabolizar el succinato, implicando a los cromóforos sensibilizadores a la radiación UV como derivados de la vitamina B2 (FAD) en el complejo respiratorio II y los derivados de la vitamina K2 (menaquinonas) de la cadena de transporte de electrones, iniciando una reacción en cadena de daño mediado por superóxido a través de la autoexcitación de estos componentes mencionados.

Conclusiones

Este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* en la actividad respiratoria y citocrómica de *E. coli* uropatógena, demostrando primeramente que este aceite esencial, ante el crecimiento de la bacteria, resulto ser un compuesto bactericida efectivo, ya que, tuvo un potente efecto inhibitorio ante la cepa bacteriana. Posteriormente, al realizar las pruebas de actividad respiratoria de la bacteria utilizando a la glucosa y al succinato como sustratos fisiologicos, los resultados arrojaron que el aceite esencial de *T. vulgaris* es un potente inhibidor de la actividad respiratoria en *E. coli* uropatógena, ya que los valores en sus tasas respiratorias normales fué al rededor de 21-22 nmol O₂ min⁻¹ y al exponer las células ante las cantidades ensayadas del aceite esencial de *T. vulgaris*, este inhibio completamente la actividad respiratoria de la bacteria dando un valor de las pendientes de las curvas obtenidas igual a 0.

Finalmente, al realizar el analisis espectral de las células de *E. coli* uropatógena, los resultados nos aportaron que el aceite esencial de *T. vulgaris* disminuyó la reducción del citocromo *d* presente en las células de *E. coli* uropatógena. Este resultado nos condujo a proponer que *T. vulgaris* produjo un efecto inhibitorio en la oxidasa terminal *bd* de *E. coli* uropatógena. Mientras que en el caso de los citocromos de tipo *b* no se observó una disminución en su reducción. Por lo que proponemos que tales citocromos pudieran formar parte de otros componentes de la célula de *E. coli* uropatógena, (como pudiera ser la oxidasa terminal *bo*) y que al poseer el grupo hemo *b* se mantienen reducidos por el efecto del succinato. Esos hemo *b* probablemente fueron parte de la otra oxidasa terminal que funciona en *E. coli* cuando crece aeróbicamente (citocromo oxidasa *bo*). Sin embargo, como las células analizadas se obtuvieron bajo condiciones estacionarias, la oxidada terminal citocrómica preferente es *bd* (condiciones microaerofílicas).

Perspectivas

- Continuar con este estudio enfocándolo en la actividad del aceite esencial de *T. vulgaris* a nivel de los componentes individuales de la cadena respiratoria de *E. coli* uropatógena.

Referencias

1. Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L., Puustinen, A., Iwata, S., and Wikström, M. (2000). The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 7:910-917.
2. Adair, F. W. (1968). Inhibition of oxygen utilization and destruction of ubiquinone by ultraviolet irradiation of *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Bacteriol.*, 95:147-151.
3. Agarwal, V., Lal, P., & Pruthi, V. (2010). Effect of Plant Oils on *Candida albicans*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 43:447-451.
4. Allen, R.J., Brenner, E.P., VanOrsdel, C.E., Hobson, J.J., Hearn, D.J., and Hemm, M.R. (2014). Conservation analysis of the CydX protein yields insights into small protein identification and evolution. *BMC Genom.* 15:946.
5. Amassmoud, O., Abbad, I., Iriti, M., Hassani, L., Mezrioui, N., & Abbad, A. (2023). Antibacterial Activity of Essential Oils Combinations based on *Thymus broussonnetii*, and Their Synergism with some Antibiotics. *Curr. Microbiol.*, 80:398.
6. Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., & González de Mejía, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 54:100-111
7. Bakó, C., Balázs, V. L., Kerekes, E., Kocsis, B., Nagy, D. U., Szabó, P., Micalizzi, G., Mondello, L., Krisch, J., Pethő, D., & Horváth, G. (2023). Flowering phenophases influence the antibacterial and anti-biofilm effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil. *BMC Complement. Med. Ther.*, 23:168.
8. Bastida-Ramírez, L. J., Buendía-González, L., Mejía-Argueta, E. L., Sandoval-Cabrera, A., García-Fabila, M. M., Pavón-Romero, S. H., Padua-Ahumada, M., & Santillán-Benítez, J. G. (2024). *Lippia origanoides* and *Thymus vulgaris* essential oils synergize with ampicillin against extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Microorg.*, 12:1702.
9. Beebout, C. J., Sominsky, L. A., Eberly, A. R., Van Horn, G. T., & Hadjifrangiskou, M. (2021). Cytochrome bd promotes *Escherichia coli* biofilm antibiotic tolerance by regulating accumulation of noxious chemicals. *NPJ Biofilms Microbi.*, 7:35.

10. Bisso-Andrade A. (2018). Resistencia a antimicrobianos. *Rev. Soc. Peru Med. Interna.* 31:50-59.
11. Blango, M. G., & Mulvey, M. A. (2010). Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics. *Antimicro. Agents. Chemother.*, 54:1855-1863.
12. Borisov, V.B., Gennis, R.B., Hemp, J., and Verkhovsky, M.I. (2011a). The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1807:1398-1413.
13. Borisov, V.B., & Verkhovsky, M.I. (2015). Oxygen as Acceptor. *EcoSal Plus* 6.
14. Borugă O., Jianu C., Mișcă C., Goleț I., Gruia A.T., and Horhat F.G. (2014). *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *J. Med. Life*, 3:56-60.
15. Brandes, A., Dunning, M., & Langland, J. (2024). Antimicrobial Activity of Individual Volatile Compounds from Various Essential Oils. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 29: 1811.
16. Bunduki, G. K., Heinz, E., Phiri, V. S., Noah, P., Feasey, N., & Musaya, J. (2021). Virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infecti. Dis.*, 21:753.
17. Burgos, A. N., and Morales, M. A. (2010). Estudio cualitativo del uso de plantas medicinales en forma complementaria o alternativa con el consumo de fármacos en la población rural de la ciudad de Bulnes, Región del Bío-Bío, Chile. *B. Latinoam. Caribe PL.*, 9:377-387.
18. Burt SA, Ojo-Fakunle VTA, Woertman J, Veldhuizen EJA (2014) The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum* and Reduces Bacterial Biofilm Formation at Sub-Lethal Concentrations. *PLOS ONE* 9: e93414.
19. Buru, A. S., Neela, V. K., Mohandas, K., & Pichika, M. R. (2022). Microarray analysis of the genomic effect of eugenol on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27:3249.

20. Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *J. Antibiot.*, 9:147.
21. Cho T.J., Min P.S., Haryyu, Seo G.H., Kim H.W., Kim S.A., and Rhee M.S. (2020). Recent advances in the application of antibacterial complexes using essential oils. *Molecules*. 25:1752-1774.
22. Choudhary, M., Shrivastava, R., & Vashisth, J. (2022). Eugenol and geraniol impede *Csuspilus* assembly and evades multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* biofilms: In-vitro and in-silico evidence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 636(Pt 2):10–17.
23. Costa, L. V., Moreira, J. M. A. R., Menezes, I. G., Dutra, V., & de Almeida, A. D. B. P. F. (2022). Antibiotic resistance profiles and activity of clove essential oil (*Syzygium aromaticum*) against *Pseudomonas aeruginosa* isolated of canine otitis. *Vet. World*, 15:2499-2505.
24. Cotter, P. A., Chepuri, V., Gennis, R. B., & Gunsalus, R. P. (1990). Cytochrome o (cyoABCDE) and d (cydAB) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene product. *J. Bacteriol.*, 172:6333-6338.
25. D'mello, R., Hill, S., & Poole, R. K. (1996). The cytochrome bd quinol oxidase in *Escherichia coli* has an extremely high oxygen affinity and two oxygen-binding haems: implications for regulation of activity in vivo by oxygen inhibition. *Microbiol. (Reading, England)*, 142:755-763.
26. de Sousa, D. P., Damasceno, R. O. S., Amorati, R., Elshabrawy, H. A., de Castro, R. D., Bezerra, D. P., Nunes, V. R. V., Gomes, R. C., & Lima, T. C. (2023). Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. *Biomolecules*, 13:1144.
27. Dong, Y., Wei, Z., Yang, R., Zhang, Y., Sun, M., Bai, H., Mo, M., Yao, C., Li, H., & Shi, L. (2023). Chemical Compositions of Essential Oil Extracted from Eight Thyme Species and Potential Biological Functions. *Plants*, 12:4164.
28. Dunlap, W. C., Fujisawa, A., & Yamamoto, Y. (2002). UV radiation increases the reduced coenzyme Q ratio in marine bacteria. *Redox Rep.*, 7:320-323.

29. Dupuis, V., Cerbu, C., Witkowski, L., Potarniche, A. V., Timar, M. C., Żychska, M., & Sabliov, C. M. (2022). Nanodelivery of essential oils as efficient tools against antimicrobial resistance: a review of the type and physical-chemical properties of the delivery systems and applications. *Drug Deliv.*, 29:1007-1024.
30. Ebani, V. V., Nardoni, S., Bertelloni, F., Pistelli, L., & Mancianti, F. (2018). Antimicrobial activity of five essential oils against bacteria and fungi responsible for urinary tract infections. *Molecules*, 23:1668.
31. Edwards-Jones, V., Buck, R., Shawcross, S. G., Dawson, M. M., & Dunn, K. (2004). The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. *Burns*, 30:772-777.
32. Esposito, S., Biasucci, G., Pasini, A., Predieri, B., Vergine, G., Crisafi, A., Malaventura, C., Casadio, L., Sella, M., Pierantoni, L., Gatti, C., Paglialonga, L., Sodini, C., La Scola, C., Bernardi, L., Autore, G., Canto, G. D., Argentiero, A., Cantatore, S., Ceccoli, M., Iughetti, L. (2022). Antibiotic resistance in paediatric febrile urinary tract infections. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 29:499-506.
33. Etri, K., & Pluhár, Z. (2024). Exploring chemical variability in the essential oils of the *Thymus* Genus. *Plants (Basel, Switzerland)*, 13:1375.
34. Flores-Encarnación M., Contreras-Zentella M., Soto-Urzuza L., Aguilar G.R., Baca B.E., and Escamilla J. E. (1999). The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. Bacteriol.*, 18:6987-6995.
35. Flores-Encarnación M., Espino-Benítez A.S., Aguilar-Gutiérrez G.R., Martínez-Flores L.D., Xicohtencatl-Cortes J., Carreño-López R., Cabrera-Maldonado C. (2020). The effect of *Thymus vulgaris* on the respiratory activity of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Res. Stud. Biosci.* 8:2349-2355.
36. Flores-Villa, E., Sáenz-Galindo, A., Castañeda-Facio, A. O., & Narro-Céspedes, R. I. (2020). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. *Tip rev. espec. cienc. quím.-biol.*, 23:1-17.
37. Fujimoto, N., Kosaka, T., & Yamada, M. (2012). Menaquinone as well as ubiquinone as a crucial component in the *Escherichia coli* respiratory chain. En InTech eBooks.

38. Galván, Adriana-Emilce; Bellomio, Augusto; Minahk, Carlos-Javier. (2017). Efecto de la microcina J25 en la cadena respiratoria de *Escherichia coli*; [Tesis doctoral no publicada], 27-3.
39. Ganić, T., Vuletić, S., Nikolić, B., Stevanović, M., Kuzmanović, M., Kekić, D., Đurović, S., Cvetković, S., & Mitić-Ćulafić, D. (2022). Cinnamon essential oil and its emulsion as efficient antibiofilm agents to combat *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.*, 13: 667-989.
40. Gimeno-Gasca, J. M. (2001). Tomillo (*Thymus vulgaris L.*). *Medicina Natur.*, 3:173-175.
41. Giovagnoni, G., Rossi, B., Tugnoli, B., Ghiselli, F., Bonetti, A., Piva, A., & Grilli, E. (2020). Thymol and carvacrol downregulate the expression of *Salmonella typhimurium* virulence genes during an In Vitro infection on Caco-2 Cells. *Microorganisms*, 8:862.
42. Grauel, A., Kägi, J., Rasmussen, T., Makarchuk, I., Oppermann, S., Moumbock, A. F. A., Wohlwend, D., Müller, R., Melin, F., Günther, S., Hellwig, P., Böttcher, B., & Friedrich, T. (2021). Structure of *Escherichia coli* cytochrome bd-II type oxidase with bound aurachin D. *Nat. Commun.*, 12:6498.
43. Gohlke, U., Warne, A., & Saraste, M. (1997). Projection structure of the cytochrome bo ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* at 6 Å resolution. *EMBO J.*, 16: 1181-1188.
44. Goojani, H. G., Besharati, S., Chauhan, P., Asseri, A. H., Lill, H., & Bald, D. (2023). Cytochrome bd-I from *Escherichia coli* is catalytically active in the absence of the CydH subunit. *FEBS Lett.*, 597:547-556.
45. Hansen, K. C., Schultz, B. E., Wang, G., & Chan, S. I. (2000). Reaction of *Escherichia coli* cytochrome bo₃ and mitochondrial cytochrome bc₁ with a photoreleasable decylubiquinol. *BBA-Bioener.*, 1456:121-137.
46. Henkel, S. G., Ter Beek, A., Steinsiek, S., Stagge, S., Bettenbrock, K., de Mattos, M. J., Sauter, T., Sawodny, O., & Ederer, M. (2014). Basic regulatory principles of *Escherichia coli*'s electron transport chain for varying oxygen conditions. *PloS one*, 9:e107640.

47. Hooser, J., Hong, S., Gehmann, G., Gennis, R.B., and Friedrich, T. (2014). Subunit CydX of *Escherichia coli* cytochrome *bd* ubiquinol oxidase is essential for assembly and stability of the di-heme active site. *FEBS Lett.* 588:1537-1541.
48. Hoffmann, K. (2020). Essential oils. *Z. Naturforschung. C Bio. Sci.*, 75:177-177.
49. Hudz, N., Kobylinska, L., Pokajewicz, K., Horčinová Sedláčková, V., Fedin, R., Voloshyn, M., Myskiv, I., Brindza, J., Wiczorek, P. P., & Lipok, J. (2023). *Mentha piperita*: essential oil and extracts, their biological activities, and perspectives on the development of new medicinal and cosmetic products. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28:7444.
50. Ike, K. A., Omaliko, P. C., Fernander, M. C., Sanders, B. M., Enikuomehin, J. M., Alabi, J. O., Adelusi, O. O., Kholif, A. E., Thomas, M. D., & Anele, U. Y. (2025). Evaluating the Effect of an Essential Oil Blend on the Growth and Fitness of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Biology*, 14:437.
51. Ingledew, W. J., & Poole, R. K. (1984). The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 48:222-271.
52. Ismail, M., Srivastava, V., Marimani, M., & Ahmad, A. (2022). Carvacrol modulates the expression and activity of antioxidant enzymes in *Candida auris*. *Res. Microbiol.*, 173:103916.
53. Jesse, H.E., Nye, T.L., McLean, S., Green, J., Mann, B.E., and Poole, R.K. (2013). Cytochrome *bd*-I in *Escherichia coli* is less sensitive than cytochromes *bd*-II or *bo*'' to inhibition by the carbon monoxide-releasing molecule, CORM-3: N-acetylcysteine reduces CO-RM uptake and inhibition of respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 1834: 1693-1703.
54. Kara, A., Massaro, C., Giammanco, G. M., Alduina, R., & Boussoualim, N. (2024). Phylogenetic diversity, antibiotic resistance, and virulence of *Escherichia coli* strains from urinary tract infections in Algeria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 13:773.
55. Kashket, E. R., & Brodie, A. F. (1962b). Effects of near-ultraviolet irradiation on growth and oxidative metabolism of bacteria. *J. Bacteriol.*, 83:1094-1100.

56. Kavanaugh, N. L., & Ribbeck, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78:4057-4061.
57. Khan, I., Bahuguna, A., Kumar, P., Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2017). Antimicrobial potential of Carvacrol against Uropathogenic *Escherichia coli* via membrane disruption, depolarization, and reactive oxygen species generation. *Front. Microbiol.*, 8:2421.
58. Khan, I., Bahuguna, A., Shukla, S., Aziz, F., Chauhan, A. K., Ansari, M. B., Bajpai, V. K., Huh, Y. S., & Kang, S. C. (2020). Antimicrobial potential of the food-grade additive carvacrol against uropathogenic *E. coli* based on membrane depolarization, reactive oxygen species generation, and molecular docking analysis. *Microb. Pathog.*, 142: 104046.
59. Kong, A. S., Lim, S. E., Cheng, W. H., Yuswan, M. H., Tan, N. P., & Lai, K. S. (2025). Harnessing monoterpenes and monoterpenoids as weapons against antimicrobial resistance. *Pol. J. Microbiol.*, 74:1-18.
60. Kowalczyk A., Przychodna M., Sopata S., Bodalska A., and Fecka I. (2020). Thymol and Thyme essential oil—New insights into selected therapeutic applications. *Molecules* , 25:4125-4142.
61. Kumar M, N., Bhat, S., Bhat K, A., Saralaya, V., & Shenoy Mulki, S. (2022). Characterization of virulence factors and antibiotic resistance pattern of uropathogenic *Escherichia coli* strains in a tertiary care center. *F1000Research*, 11: 1163.
62. Kumar Pandey, V., Shams, R., Singh, R., Dar, A. H., Pandiselvam, R., Rusu, A. V., & Trif, M. (2022). A comprehensive review on clove (*Caryophyllus aromaticus L.*) essential oil and its significance in the formulation of edible coatings for potential food applications. *Front. Nutr.*, 9:674-987.
63. Kvam, E., & Benner, K. (2020). Mechanistic insights into UV-A mediated bacterial disinfection via endogenous photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 209:111-899.

64. Lagha R, Ben Abdallah F, Al-Sarhan BO, Al-Sodany Y. (2019) Antibacterial and Biofilm inhibitory activity of medicinal plant essential oils against *Escherichia coli* isolated from UTI patients. *Molecules*, 24:1161-1173.
65. Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. (2017). Essential oils of oregano: biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22:989-1013.
66. Liu M-H., Otsuka N. and Noyori K. (2008). Synergistic effect of kaempferol glycosides purified from *Laurus nobilis* and fluoroquinolones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* 32:489-92.
67. López-Ambrocio R.M., Ruiz-Posadas L.M., and Delgadillo-Martínez J. (2016). Antimicrobial activity of thyme essential oil (*Thymus vulgaris L.*). *Agro. Product.*, 9:78-82.
68. López González G.J., Barrera Chávez I.D., García Andrade A., López Briones S., y Hernández Luna M.A. (2022). Presencia del biofilm y su asociación con la resistencia de antibióticos de cepas de aislados clínicos de *Escherichia coli* de pacientes con infecciones de vías urinarias. *Jóv. en la ciencia*, 16:1-8.
69. Macêdo, N. S., de Sousa Silveira, Z., Cordeiro, P. P. M., Coutinho, H. D. M., Júnior, J. P. S., Júnior, L. J. Q., Siyatpanah, A., Kim, B., da Cunha, F. A. B., & da Silva, M. V. (2022). Inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pump by O-Eugenol and its toxicity in *Drosophila melanogaster* animal model. *BioMed Res. Int.*, 1440996.
70. Maniki, E., Kostoglou, D., Paterakis, N., Nikolaou, A., Kourkoutas, Y., Papachristoforou, A., & Giaouris, E. (2023). Chemical composition, antioxidant, and antibiofilm properties of essential oil from *Thymus capitatus* plants organically cultured on the greek island of Lemnos. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28:1154.
71. Mansouri, N., Aoun, L., Dalichaouche, N., & Hadri, D. (2018). Yields, chemical composition, and antimicrobial activity of two Algerian essential oils against 40 avian multidrug-resistant *Escherichia coli* strains. *Veterinary world*, 11:1539-1550.
72. Mascolo, Ludovica & Bald, Dirk. (2019). Cytochrome bd in Mycobacterium tuberculosis: A respiratory chain protein involved in the defense against antibacterials. *Prog. Biophys. Mol. Bio.*, 152.

73. Mechmechani, S., Gharsallaoui, A., Fadel, A., El Omari, K., Khelissa, S., Hamze, M., & Chihib, N. E. (2022). Microencapsulation of carvacrol as an efficient tool to fight *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* biofilms. *PloS one*, 17: e0270200.
74. Micucci, M., Protti, M., Aldini, R., Frosini, M., Corazza, I., Marzetti, C., Mattioli, L. B., Tocci, G., Chiarini, A., Mercolini, L., & Budriesi, R. (2020). *Thymus vulgaris* L. essential oil solid formulation: chemical profile and spasmolytic and antimicrobial effects. *Biomol.*, 10:860.
75. Mollea, C., Bosco, F., & Fissore, D. (2022). Agar plate methods for assessing the antibacterial activity of thyme and oregano essential oils against *S. epidermidis* and *E. coli*. *Antibiot.*, 11:1809.
76. Momtaz, S., Hassani, S., Khan, F., Ziaee, M., & Abdollahi, M. (2017). Cinnamon, a promising prospect towards Alzheimer's disease. *Pharmacol. Res.*, 130:241-258.
77. Mouanga Ndzime, Y., Onanga, R., Kassa Kassa, R. F., Bignoumba, M., Mbehang Nguema, P. P., Gafou, A., Lendamba, R. W., Mbombe Moghoa, K., & Bisseye, C. (2021). Epidemiology of community origin *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* uropathogenic strains resistant to antibiotics in Franceville, Gabon. *Infect. Drug. Resist.*, 14:585-594.
78. Mustafa, G., Migita, C. T., Ishikawa, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., & Yamada, M. (2008). Menaquinone as well as ubiquinone as a bound quinone crucial for catalytic activity and intramolecular electron transfer in *Escherichia coli* membrane-bound glucose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 283:28169-28175.
79. Nasrollahian, S., Graham, J. P., & Halaji, M. (2024). A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of *E. coli*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 14:387-497.
80. Nastasi, M. R., Borisov, V. B., & Forte, E. (2023). The terminal oxidase cytochrome bd-I confers carbon monoxide resistance to *Escherichia coli* cells. *J. Inorg. Biochem.*, 247:112341.

81. O'Bryan C.A., Pendleton S.J., Crandall P.G. and Ricke S.C. (2015). Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture- in vitro studies on antibacterial mode of action. *Front. Vet. Sci.* 2:1-8.
82. Park, S. Y., Raka, R. N., Hui, X. L., Song, Y., Sun, J. L., Xiang, J., Wang, J., Jin, J. M., Li, X. K., Xiao, J. S., & Wu, H. (2023). Six Spain Thymus essential oils composition analysis and their in vitro and in silico study against *Streptococcus mutans*. *BMC Complement. Med. Ther.*, 23:106.
83. Parra-Sepúlveda S. (2020). Estudio de la composición química y actividad biológica de aceites esenciales de cardamomo (*Elettaria cardamomum*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). (Tesis de pregrado). Universidad Santo Tomás, Bucaramanga, Colombia.
84. Pastrana-Puche Y. I., Durango-Villadiego A. M. and Acevedo-Correa D. (2017). Antimicrobial effect of Cloves and Cinnamon on pathogens. *Biotec. Agrop. Agroci.*, 15:56-65.
85. Paudel, A., Hamamoto, H., Panthee, S., & Sekimizu, K. (2016). Menaquinone as a potential target of antibacterial agents. *Drug Discover. Therap.*, 10:123-128.
86. Peluche, Y. I. P., Correa, D. A., y Villadiego, A. M. D. (2017). Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patógenos. *Biotec. Agrop. Agroci.* 15:56-65.
87. Peñuela, Oscar Andrés. (2005). Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Colombia Médica*, 36(3), 215-225. Retrieved July 22, 2024.
88. Price, C. E., & Driessen, A. J. (2010). Biogenesis of membrane bound respiratory complexes in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta*, 1803(6), 748-766.
89. Podda, M., Traber, M. G., Weber, C., Yan, L., & Packer, L. (1998). UV-Irradiation Depletes Antioxidants and Causes Oxidative Damage in a Model of Human Skin. *Free Radical Biology And Medicine*, 24:55-65.
90. Qi, J., Gong, M., Zhang, R., Song, Y., Liu, Q., Zhou, H., Wang, J., & Mei, Y. (2021). Evaluation of the antibacterial effect of tea tree oil on *Enterococcus faecalis* and biofilm in vitro. *J. Ethnopharmacol.*, 281:114566.
91. Radloff, M., Elamri, I., Grund, T. N., Witte, L. F., Hohmann, K. F., Nakagaki, S., Goojani, H. G., Nasiri, H., Hideto Miyoshi, Bald, D., Xie, H., Sakamoto, J., Schwalbe,

- H., & Safarian, S. (2021). Short-chain aurachin D derivatives are selective inhibitors of *E. coli* cytochrome bd-I and bd-II oxidases. *Scientific reports*, 11:23852
92. Raeispour-Maryam and Ranjbar- Reza (2018). Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 7:118-127.
93. Rahman, M. M., Hossain, M. M. K., Rubaya, R., Halder, J., Karim, M. E., Bhuiya, A. A., Khatun, A., & Alam, J. (2022). Association of Antibiotic Resistance Traits in Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Isolates. *Canadian Journal Of Infectious Diseases And Medical Microbiology.* 2022:1-9.
94. Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Čebović, T., Vukmirović, S., & Mikov, M. (2014). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC complementary and alternative medicine*, 14:225.
95. Romanescu, M., Oprean, C., Lombrea, A., Badescu, B., Teodor, A., Constantin, G. D., Andor, M., Folescu, R., Muntean, D., Danciu, C., Dalleur, O., Batrina, S. L., Cretu, O., & Buda, V. O. (2023). Current state of knowledge regarding WHO high priority pathogens-resistance mechanisms and proposed solutions through candidates such as essential oils: A systematic review. *Int. J. Mol. Sci.*, 24:9727.
96. Rozwadowski, M., & Gawel, D. (2022). Molecular factors and mechanisms driving multidrug resistance in Uropathogenic *Escherichia coli*-An update. *Genes*, 13:1397.
97. Rubio-Ortega, Annie, Travieso-Novelles, María del Carmen, Riverón-Alemán, Yamilka, Martínez-Vasallo, Ailin, Peña-Rodríguez, Joan, Espinosa-Castaño, Ivette, & Pino-Pérez, Oriela. (2018). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de plantas cultivadas en Cuba sobre cepas de *Salmonella enterica*. *Rev. Salud Anim.*, 40.
98. Sabo, V. A., Mimica-Dukic, N., Kostanjsek, R., & Knezevic, P. (2024). Essential oils cause membrane disruption and autoaggregation of MDR *Acinetobacter baumannii* cells. *S.Afr. J. Bot.*, 174:208-217.
99. Sánchez-Tito, Marco Antonio, & Layme-Huanca, Milder Raquel. (2022). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* frente a *Enterococcus faecalis*. *Rev. Cub. Estomat.*, 59.

100. Sattayakhom, A., Wichit, S., & Koomhin, P. (2023). The effects of essential oils on the nervous system: A scoping review. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28:3771.
101. Schultz, B. E., & Chan, S. I. (1998). Thermodynamics of electron transfer in *Escherichia coli* cytochrome bo₃. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), 11643–11648.
102. Shaban, S., Patel, M., & Ahmad, A. (2020). Improved efficacy of antifungal drugs in combination with monoterpene phenols against *Candida auris*. *Sci. Rep.*, 10:1162.
103. Shahin, H. H., Baroudi, M., Dabboussi, F., Ismail, B., Salma, R., Osman, M., & El Omari, K. (2025). Synergistic Antibacterial Effects of Plant Extracts and Essential Oils Against Drug-Resistant Bacteria of Clinical Interest. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 14:348.
104. Šimunović, K., Bucar, F., Klančnik, A., Pompei, F., Paparella, A., & Smole Možina, S. (2020). In Vitro effect of the common culinary herb Winter Savory (*Satureja montana*) against the infamous food pathogen *Campylobacter jejuni*. *Foods* (Basel, Switzerland), 9:537.
105. Siletsky, S. A., Rappaport, F., Poole, R. K., & Borisov, V. B. (2016). Evidence for fast electron transfer between the High-Spin Haems in Cytochrome *bd-I* from *Escherichia coli*. *PloS one*, 11:e0155186.
106. Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Griensven, L. J. L. D. v. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *In vitro* model. *Molecules*, 15:7532-7546.
107. Sousa, P. M., Silva, S. T., Hood, B. L., Charro, N., Carita, J. N., Vaz, F., Penque, D., Conrads, T. P., & Melo, A. M. (2011). Supramolecular organizations in the aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Biochimie*, 93:418-425.
108. Stefanova, G., Girova, T., Gochev, V., Stoyanova, M., Petkova, Z., Stoyanova, A., & Zheljaskov, V. D. (2020). Comparative study on the chemical composition of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves from Greece and Georgia and the antibacterial activity of their essential oil. *Heliyon*, 6:e05491.

109. Swamy M.P., Akhtar M.S., and Sinniah U.R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Rev. Tec. Ciencia.* 37:92-100
110. Thanissery, R., Kathariou, S., & Smith, D. (2014). Rosemary oil, clove oil, and a mix of thyme-orange essential oils inhibit *Salmonella* and *Campylobacter* in vitro. *J. Appl. Poultry Res.*, 23:221-227.
111. Thöny-Meyer L. (1997). Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews:MMBR*, 61(3), 337–376.
112. Tikhonova, T. V., & Popov, V. O. (2014). Structural and functional studies of multiheme cytochromes C involved in extracellular electron transport in bacterial dissimilatory metal reduction. *Biochemistry* 79:1584-1601.
113. Tongnuanchan, P., and Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *J. food science.* 79:1231-1249.
114. Tran, H. N. H., Udoh, S., Russell, G., Okeyoyin, O. R., Aftab, S., Rodriguez, I., Tabe, E. S., & Adukwu, E. C. (2022). Recent advances in the application of essential oils as potential therapeutic candidates for *Candida*-Related infections. *J. Appl. Microbiol.*, 2:397-413.
115. Tran, Q. H., & Unden, G. (1998). Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation. *Eur. J. Biochem.*, 251:538-543.
116. van der Oost, J., Lappalainen, P., Musacchio, A., Warne, A., Lemieux, L., Rumbley, J., Gennis, R. B., Aasa, R., Pascher, T., & Malmström, B. G. (1992). Restoration of a lost metal-binding site: construction of two different copper sites into a subunit of the *E. coli* cytochrome o quinol oxidase complex. *EMBO J.*, 11:3209-3217.
117. Verspohl E.J., Bauer K., Neddermann E. (2005). Antidiabetic effect of *Cinnamomum zeylanicum* in vivo and in vitro. *Phytother. Res.*, 19:203-206.
118. Visan, A. I., & Negut, I. (2024). Coatings based on essential oils for combating antibiotic resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 13:625.

119. Walasek-Janusz, M., Grzegorzczak, A., Malm, A., Nurzyńska-Wierdak, R., & Zalewski, D. (2024). Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activity of oregano essential oil. *Molecules* (Basel, Switzerland), 29:435.
120. Wang, Y., Hong, X., Liu, J., Zhu, J., & Chen, J. (2020). Interactions between fish isolates *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus aureus* in dual-species biofilms and sensitivity to carvacrol. *Food Microbiol.*, 91:103506.
121. Wang, X., Shen, Y., Thakur, K., Han, J., Zhang, J. G., Hu, F., & Wei, Z. J. (2020). Antibacterial activity and mechanism of ginger essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25:3955-3972.
122. Wu, H., Tuli, L., Bennett, G. N., & San, K. Y. (2015). Metabolic transistor strategy for controlling electron transfer chain activity in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.*, 28:159-168.
123. Yap, L.L., Lin, M.T., Ouyang, H., Samoilova, R.I., Dikanov, S.A., and Gennis, R.B. (2010). The quinone-binding sites of the cytochrome *bo3* ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1924-1932.
124. Zeng, Q., Xiao, S., Gu, F., He, W., Xie, Q., Yu, F., & Han, L. (2021). Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from female patients in Shanghai, China. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 11:653-983.
125. Zhou, Y., Zhou, Z., Zheng, L., Gong, Z., Li, Y., Jin, Y., Huang, Y., & Chi, M. (2023). Urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli*: Mechanisms of infection and treatment options. *Int. J. Mol. Sci.*, 24:310-537.
126. Zhu, X., Aoyama, E., Birk, A. V., Onasanya, O., Carr, W. H., Mourokh, L., Minter, S. D., & Vittadello, M. (2020). Cytochrome c oxidase oxygen reduction reaction induced by cytochrome c on nickel-coordination surfaces based on graphene oxide in suspension. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.*, 1861:148-262.
127. Zych, S., Adaszyńska-Skwirzyńska, M., Szewczuk, MA, y Szczerbińska, D. (2024). Interacción entre la enrofloxacin y tres aceites esenciales (corteza de canela, clavo y flor de lavanda): un estudio sobre cepas de *Escherichia coli* multirresistentes aisladas de pollos de engorde de un día de edad. *Int. J. Mol. Sc.*, 25:5220.