



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR

TESIS PROFESIONAL

Efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en la respiración de

*Escherichia coli* uropatógena

PARA OBTENER EL TITULO DE LICENCIADA EN BIOMEDICINA

TESIS QUE PRESENTA:

Ángeles Sahian Espino Benítez

DIRECTOR

D.C. Marcos Flores Encarnación

Octubre 2021

## **Agradecimientos**

**A mis padres, Jorge Espino y Angeles Benítez que siempre han estado apoyándome en este largo camino y me han enseñado a valorar la vida y luchar por lo que quiero, sin rendirme en ningún momento.**

**A mis hermanas Laura y Heidi que me aconsejan y apoyan cuando más los necesito, pues han estado para mí en los momentos más difíciles de mi vida.**

**A mis hermanas de otros padres Andrea y Selena que en ningún momento dejaron de confiar en mí, pues cada que yo decía ya no puedo más, ya necesito regresarme a mi casa, siempre me impulsaban a decir, puedo con esto y más.**

**A mis lobas, nunca me abandonaron y siempre me sacaban una sonrisa en los entrenamientos después de un día cansado.**

**Por último, a mi asesor de tesis, el Dr. Marcos Flores, que, sin su paciencia, regaños, apoyo incondicional, no podría haber logrado esto.**

## Índice

1. Introducción.....	5
2. Antecedentes.....	8
2.1. Antecedentes generales.....	8
2.2. Antecedentes específicos.....	14
3. Planteamiento del problema.....	20
4. Justificación.....	21
5. Hipótesis.....	22
5.1. H1.....	22
5.2. H0.....	22
6. Objetivos.....	23
6.1 Objetivo general.....	23
6.2 Objetivo específico.....	23
7. Metodología .....	24
7.1. Material biológico y químico.....	24
7.2. Crecimiento de <i>E. coli</i> uropatógena.....	24
7.3. Efecto del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> , sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> uropatógena.....	24
7.4. Determinación de la tasa de respiración de <i>E. coli</i> uropatógena usando diferentes sustratos, y el efecto de la presencia del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> .....	25
7.5. Permeado de células de <i>E. coli</i> uropatógena.....	26

7.6. Medición de tasa de respiración de células permeadas de <i>E. coli</i> uropatógena.....	26
8. Esquema de trabajo.....	27
9. Resultados.....	28
9.1. Efecto del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> , sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> uropatógena.....	28
9.2. Tasa de respiración de <i>E. coli</i> uropatógena usando diferentes sustratos, y el efecto de la presencia del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> .....	33
9.3. Tasa de respiración de células permeadas de <i>E. coli</i> uropatógena, usando diferentes sustratos.....	35
10. Discusión.....	38
11. Bibliografía.....	42

## Resumen

Los aceites esenciales son compuestos orgánicos que han demostrado propiedades antimicrobianas. Algunos aceites esenciales son potentes agentes bactericidas; tal es el caso de *Thymus vulgaris*. Se ha informado que el aceite esencial de *T. vulgaris* es un inhibidor del crecimiento bacteriano tanto de bacterias Gram positivas, como Gram negativas. Así mismo este aceite presenta potentes propiedades bactericidas que incluyen eficacia frente a cepas resistentes a los antibióticos. No se han descrito en su totalidad los mecanismos responsables de la actividad antibacteriana de *T. vulgaris*, sin embargo, algunos estudios mencionan que altera la permeabilidad de membrana bacteriana. Para corroborar esta teoría nos dimos a la tarea generar artificialmente alteraciones en la membrana de *E. coli* uropatógena y medir su actividad respiratoria, dando como resultado una disminución del consumo de oxígeno, sin embargo, no fue suficiente para provocar un cese total, si no solo del 80%. Tal resultado nos fue controversial ya que también se hicieron mediciones de la actividad respiratoria de *E. coli* uropatógena agregando diferentes cantidades del aceite esencial de *T. vulgaris*, teniendo como resultado un cese total de la actividad respiratoria. Por tal motivo en este trabajo determinamos que el bloqueo de la actividad respiratoria es el principal mecanismo de acción antimicrobiano del aceite esencial de *T. vulgaris* sobre *E. coli* uropatógena.

## 1. Introducción

La aparición y propagación de patógenos farmacorresistentes que han adquirido nuevos mecanismos de resistencia, debido al uso inadecuado e irracional de los antimicrobianos, así como la automedicación y la prescripción excesiva de antibióticos, a causa de la incertidumbre diagnóstica de cuadros clínicos de etiología viral o bacteriana similares, se ha convertido en un importante problema de salud pública (**Espinosa-Castaño et al., 2019, Dreser et al., 2008, Tang et al. 2014**). Los mecanismos de resistencia antimicrobiana han surgido casi de manera simultánea a la aparición de nuevos antibióticos (**Tang et al. 2014**). A pesar de que se han realizado diversas modificaciones estructurales de las clases de antibióticos, con el fin de ampliar el espectro de acción hacia los aislados resistentes, la situación ha ido empeorando, a tal punto de contar con pocas opciones de antibióticos efectivos. En la actualidad, los porcentajes de resistencia son tan altos que han incrementado el índice de mortalidad, el costo en el tratamiento y atención médica; por lo tanto, ha surgido la necesidad de descubrir nuevos antimicrobianos (**Chávez-Jacobo, 2020; Pérez-Delgado, 2019; Prestinaci et al., 2015**).

Para la industria farmacéutica una fuente óptima para la obtención de fármacos son las plantas con propiedades medicinales. Se ha reportado que alrededor del 80% de la población mundial, utiliza medicina complementaria derivada principalmente de plantas (**Ekor, 2014**). En ese sentido la fitoterapia, se ha convertido en una herramienta útil como complemento terapéutico contra infecciones bacterianas. El auge de la fitoterapia se ha visto favorecido por la seguridad que generan los medicamentos naturales en los pobladores, y debido a que proporcionan posibilidades terapéuticas más amplias que las medicinas tradicionales e inferior posibilidad de efectos colaterales (**Aslam et al., 2018; Ekor, 2014; Karunamoorthi et al., 2013; Palhares et al. 2015; Sofowora et al., 2013**).

Esto ha causado el aumento en la tendencia del uso de sustancias naturales que han llegado a constituir una alternativa promisoriosa con actividad antimicrobiana (**Aljabeili et al., 2019; Aziz et al., 2018; Borboa et al., 2010**). Las compañías

farmacéuticas están buscando drogas alternativas de otras fuentes incluyendo las plantas y los animales (**García et al., 2010**). Dichas plantas utilizadas como materia prima para la producción de extractos o para el aislamiento de sus sustancias naturales puras (como los aceites esenciales) representa un área en franca expansión (**Cañigueral & Vila, 2007**).

Se han considerado como antibióticos naturales a los aceites esenciales, puesto que puede ser utilizados en la producción de nuevos agentes con actividad antimicrobiana, de interés para la industria farmacéutica y alimentaria (**Castaño et al., 2009**). Los aceites esenciales son compuestos volátiles, líquidos de consistencia oleosa a temperatura ambiente, sin embargo, en algunos casos pueden ser sólidos o resinosos (**Bassolet & Juliani, 2012**). Se obtienen de diferentes partes de las plantas, como las flores, semillas, hojas, cortezas, brotes, y también de la madera, las frutas y algunas raíces. Respecto al método de extracción pueden ser extraídos por destilación, presión en frío, usando solventes orgánicos, entre otros, sin embargo, el más utilizado en la producción comercial es por la destilación y arrastre de vapor. (**Bakkali et al., 2008; Borboa et al., 2010**). El rendimiento del aceite es variable y depende de diversos factores, entre los que cabe resaltar, las condiciones ambientales de crecimiento del espécimen y los procesos de obtención. Una situación similar sucede con la composición química de cada aceite esencial, ya que, pese a pertenecer a la misma especie de planta pueden presentarse variaciones según el genotipo o quimiotipo, creando de este modo, diferencias en sus posibles efectos terapéuticos (**Elnaiem et al., 2012; Rubiolo et al., 2010**). Los aceites esenciales son conocidos por sus propiedades antisépticas y medicinales (analgésicas, sedantes, antiinflamatorias, anestésicos locales, inclusive como anticancerígenos). También se utilizan en embalsamamientos y, por su actividad antimicrobiana y antioxidante, como aditivos naturales en alimentos y productos alimenticios (**Cañigueral & Vila, 2007**).

La principal ventaja que se ha reportado de estos productos naturales es que no propician resistencia como se ha observado en el caso de los antibióticos, lo cual

podría ser atribuido a la presencia de múltiples compuestos que actúan en distintos sitios blanco de las bacterias, destruyéndolas en periodos de tiempo muy cortos **(Fournomiti et al., 2012; Pino-Pérez et al., 2012)**.

Uno de los aceites esenciales con mayores reportes de actividad antimicrobiana es el aceite de *Thymus vulgaris* (tomillo), que presenta una potente actividad bactericida contra bacterias Gram negativas y positivas **(Benameur et al., 2018)**. Sin embargo, poco se sabe acerca de su mecanismo de acción; hasta ahora el mecanismo reportado corresponde a la alteración de la permeabilidad de la membrana citoplasmática **(Chiasson et al., 2004; García-García & Palou-García, 2008)**. Estudios previos realizados en el laboratorio, donde se observó una alta actividad antimicrobiana del aceite esencial de *T. vulgaris*, nos llevó a querer investigar acerca del mecanismo de acción que presenta este aceite esencial, así como algunas de sus otras propiedades terapéuticas, tal motivo nos llevó a sospechar que esta sustancia podría presentar no solo un mecanismo de acción, si no varios. Por ello, en esta propuesta de trabajo se consideró la posibilidad de estudiar un mecanismo que inhibiera la respiración a nivel de la cadena transportadora de electrones, usando a *Escherichia coli* uropatógena como modelo de experimentación.



## 2. Antecedentes

### 2.1 Antecedentes generales

Ciertamente, las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivadas de sus actividades metabólicas enfocadas a sus sistemas de defensa contra de microorganismos, insectos, herbívoros que se encuentran en su entorno, produciendo grandes cantidades de metabolitos secundarios (**García et al., 2010**). Entre los metabolitos secundarios importantes relacionados con los mecanismos de defensa, destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, glicósidos, lectinas y polipéptidos, de los cuales, se han reportado cerca de 8000 polifenoles, 270 aminoácidos no proteicos, 32 cianógenos, 10,000 alcaloides, varias saponinas y esteroides (**Borboa et al., 2010; Carmona, 2007; Domingo & López-Brea, 2003**). La biosíntesis de estas moléculas es llevada a cabo, ya sea de manera constitutiva o bien de manera inducida, como parte de la respuesta defensiva de las plantas en contra de una infección por bacterias, hongos o nemátodos (**García et al., 2010**). Los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro grupos principales: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides, los cuales presentan diferentes propiedades farmacológicas como se observa en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación de los metabolitos secundarios y sus propiedades farmacológicas.

Grupo	Compuestos presentes	Características principales	Propiedades farmacéuticas	Fuente
<b>Terpenos</b>	Hormonas, pigmentos carotenoides, esteroides, látex y aceites esenciales	Grupo de mayor importancia con más de 40,000 moléculas, se consideran de importancia para la supervivencia de las	Anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalarías, antimicrobianas	<b>Ávalos y Pérez-Urria, 2009</b>

		plantas. Son insolubles en agua y derivan de la unión de unidades de isopreno.		
<b>Compuestos fenólicos</b>	Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos	Derivan de un grupo fenol	Antidiarreicos, antitumorales, antibacteriales, antivirales e inhibidores de enzimas	<b>Ávalos y Pérez-Urria, 2009, Isaza, 2007.</b>
<b>Glicósidos</b>	Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos	Surgen a partir de la condensación de una molécula de azúcar con otra que contiene un grupo hidroxilo, formando así un enlace glucosídico	Antimicrobianas, fungicidas, insecticidas, anticancerígenos, antiinflamatoria y alelopáticas	<b>Ávalos y Pérez-Urria, 2009, Agustín et al., 2011</b>
<b>Alcaloides</b>	Quinolina, isoquinolina, indol, tropano, quinolizidina, piperidina, purina, pirrolizideno	Grupo con alrededor de 15,000 metabolitos secundarios. Son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos y algunos son compuestos alifáticos	A dosis altas, la mayoría son muy tóxicos, sin embargo, a dosis bajas funcionan como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos	<b>Ávalos y Pérez-Urria, 2009,</b>

Los aceites esenciales son una mezcla compleja de metabolitos secundarios provenientes de las plantas, se conocen aproximadamente 3000 aceites esenciales.

Entre ellos tenemos al aceite esencial de orégano, tomillo, salvia, perejil, clavo, ajo, cebolla, lavanda, menta, canela, eucalipto, etc. Estos presentan actividad antimicrobiana que varía dependiendo de especies, subespecies y variedades de las plantas (**Borboa et al., 2010; Jiménez-García & Zambrano-Gutiérrez, 2016; Marín-Muñoz, 2015; Montero-Recalde et al., 2019; Ortega-Nieblas et al., 2011; Pastrana-Puche et al., 2017**). Los aceites con un alto porcentaje de compuestos terpenoides del tipo fenólico poseen notables propiedades antimicrobianas (**Sánchez-Pérez et al., 2012**). Los terpenos que se encuentran en los aceites esenciales son generalmente monoterpenos (**Ávalos-García & Pérez-Urria, 2009**). Aunque la actividad biológica de aceites esenciales ha sido confirmada por numerosos estudios, ha habido una gran variabilidad entre ellos; esto se ha atribuido a la composición de los aceites (**Figueiredo et al., 2008**).

La actividad bactericida o bacteriostática de los aceites esenciales depende estrechamente de la concentración utilizada (**Fournomiti et al., 2015**). Se ha descrito que la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas no es la misma que se observa en bacterias Gram negativas; esto depende de la estructura de la bacteria (de la envoltura) y de la concentración utilizada del aceite esencial (**Tiwari et al., 2015**). Las bacterias Gram negativas presentan una mayor resistencia antimicrobiana a los aceites esenciales debido a que contienen una membrana interna, una membrana externa y una capa de lipopolisacáridos, que restringen la difusión de las moléculas de los aceites esenciales (**Flores-Encarnación et al., 2016; Nazarro et al., 2013**). Como consecuencia se requieren mayores concentraciones del aceite esencial para inhibir el crecimiento bacteriano (**Fisher & Phillips, 2008; Trombetta et al., 2005**).

Se reconoce que los componentes activos de plantas, hierbas y especias son compuestos fenólicos; estos compuestos son probablemente mayoritariamente los responsables de la actividad antimicrobiana presentes en los aceites esenciales (**García et al., 2010**). En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de plantas y sus componentes biológicamente activos. Por ejemplo, el orégano (*Origanum vulgare*)

contiene terpineno, cimeno, timol y carvacrol en proporciones que van del 2% hasta el 80%.

**Tabla 2.** Componentes de aceites esenciales que presentan propiedades antimicrobianas.

Nombre común	Nombre científico	Componentes	Porcentaje
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	E-2-decanal	20%
		Linalool	26%
Canela	<i>Cinnamomun zaylandicum</i>	Transcinnamaldehído	65%
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Terpineno	2-52%
		Cimeno	52%
		Timol	64%
		Carvacrol	80%
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Acetato de bornil	0-17%
		Canfor	2-14%
		Pineno	2-25%
		1,8 Cineolo	3-89%
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Acetato de eugenil	8-15%
		Eugenol	75-85%
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Carvacrol	2-11%
		Terpeno	2-31%
		Cimeno	10-56%
		Timol	10-64%

Adaptada de **Burt (2004)**

La actividad antimicrobiana de los componentes de los aceites esenciales en orden decreciente va desde los fenoles > aldehídos > cetonas > alcoholes > éteres > hidrocarburos (**Borboa et al., 2010**). En la literatura aparecen numerosos informes sobre la actividad antibacteriana de aceites esenciales. Sin embargo, se han

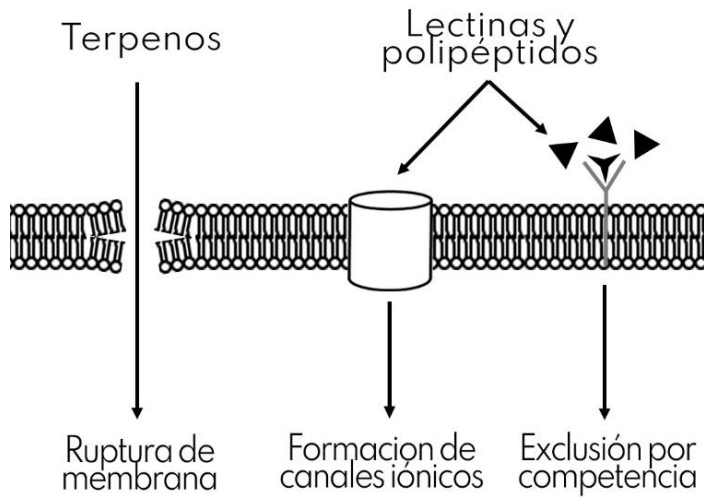
realizado muy pocos estudios relacionados con el modo de acción de estos productos naturales en la célula bacteriana (**Sánchez-Pérez et al., 2012**).

Los mecanismos de acción reportados hasta ahora de los diversos compuestos orgánicos de las plantas son variables. Por ejemplo, los terpenos están involucrados en el rompimiento de la membrana, a través de los compuestos lipofílicos. Se ha postulado que los alcaloides se intercalan en la doble cadena del ADN, mientras que las lectinas y polipéptidos pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la exclusión competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (**Fig.1**).

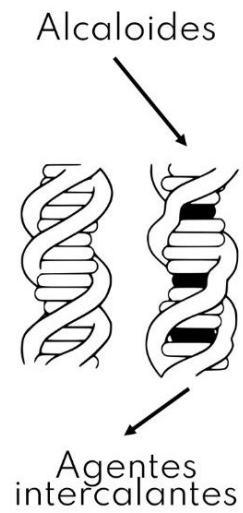
Así de manera general, se ha observado la desestabilización en la estructura de la membrana y de la pared bacteriana, alteración de la permeabilidad celular, la fuga de potasio de las células, así como alteraciones en el potencial de membrana (translocación de protones), cambios en el gradiente de pH y la producción de ATP en las células bacterianas (**Borboa et al., 2010; O'Bryan et al., 2015**). Las enzimas ATPasas que se encuentran localizadas en la membrana citoplasmática pueden ser alcanzadas por moléculas lipídicas, viéndose afectada la regulación de energía y síntesis de componentes estructurales (**García-García & Palou-García, 2008**).

Se ha informado que la actividad antimicrobiana depende principalmente de la composición de las sustancias químicas (hidrófilas o hidrofóbicas) de los aceites esenciales (**Fisher & Phillips, 2008; Holley & Patel, 2005; Solozano-Santos & Miranda-Novales, 2012**). Considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es muy probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible ni a un compuesto ni a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintos orgánulos de la célula (**Pino-Pérez et al., 2012**).

## Desestabilización de la membrana



## Daño a ADN



**Fig. 1** Mecanismos de acción antimicrobiana de los aceites esenciales.

## 2.2 Antecedentes específicos

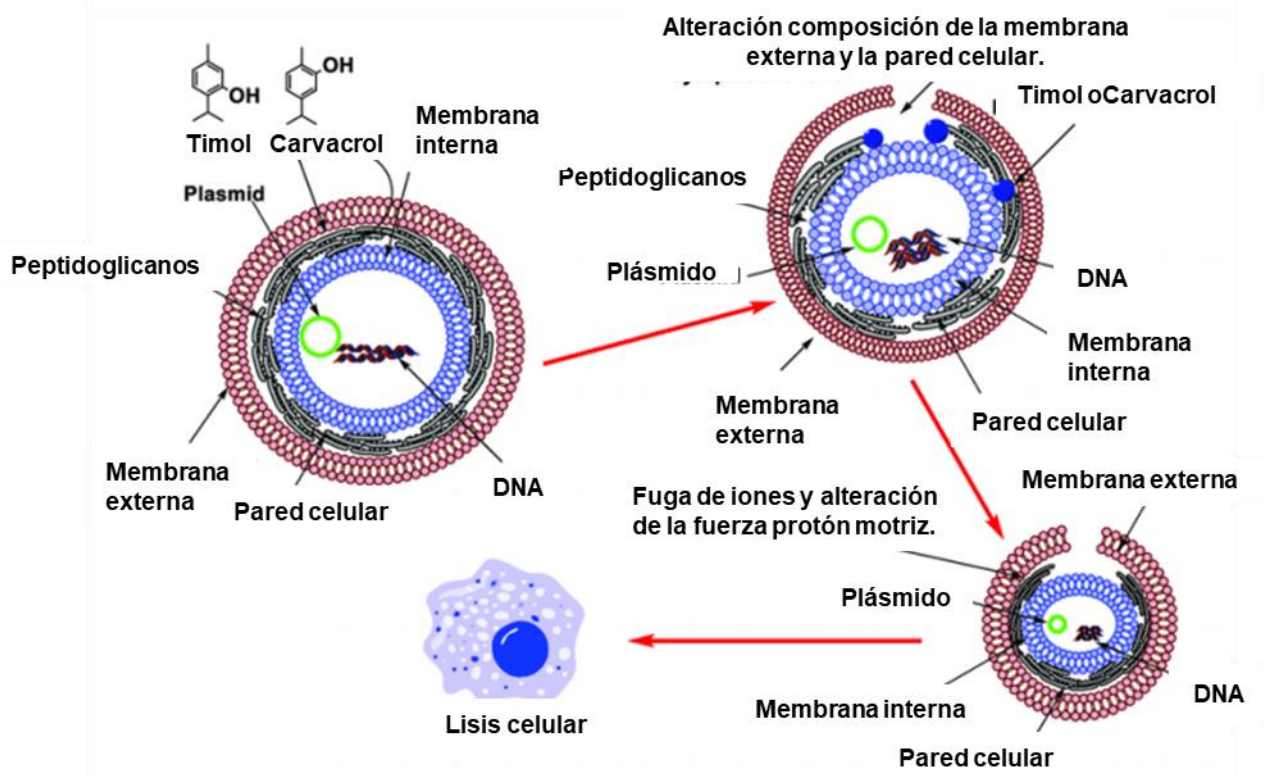
El tomillo pertenece a la familia *Lamiaceae*, posee cerca de 215 especies, siendo el género *Thymus* uno de los más importantes. Es una planta perenne, que puede alcanzar hasta 50 cm de altura, clasificada como arbusto o subarbusto, o a veces como herbácea. Es una planta aromática utilizada con fines medicinales y como condimento, destacándose por su aroma, así como por su aceite esencial volátil (**Da Rocha et al., 2012; Morales, 2018**). El tomillo es un producto natural prometedor para la industria farmacéutica ya que representa un compuesto con potencial fitoterapéutico y además de bajo costo (**Fournomiti et al., 2015**).

El aceite esencial de *T. vulgaris* y sus componentes activos, timol y carvacrol, se han utilizado como antioxidantes, antiinflamatorios, anestésicos locales, antisépticos, antibacterianos, antimicóticos y antitumorales (**Gumus et al., 2016; Jafri & Ahmad, 2020; Nickavar et al., 2005**). La propiedad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo está asociada por su carácter lipofílico (a la acumulación en membranas) y los subsecuentes eventos en las mismas. El mecanismo por el cual los compuestos fenólicos inhiben microorganismos es produciendo la sensibilización de la bicapa fosfolípida de la membrana celular, provocando un incremento en la permeabilidad y la pérdida de constituyentes celulares vitales o daño de las enzimas bacterianas (**Chiasson et al., 2004**). Generalmente el flujo de iones potasio es una muestra temprana del daño a la membrana citoplasmática, seguido del flujo de los demás constituyentes citoplasmáticos. La alteración de la permeabilidad de la membrana es identificada como la causa principal de la muerte celular y depende de la hidrofobicidad de los solutos que cruzan la membrana y de la composición de la misma. Sin embargo, algunas investigaciones señalan que este mecanismo sólo es una parte de la explicación de la actividad antimicrobiana que presenta el aceite esencial de *T. vulgaris* (**García-García & Palou-García, 2008**).

El aceite esencial de tomillo, que en su composición incluye a carvacol, borneol, geraniol y timol, ha sido reconocido por su gran actividad antimicrobiana, atribuida fundamentalmente a los fenoles timol (2-isopropil-5-metilfenol) y carvacrol (5-

isopropil-2-metilfenol), que han sido el tema de varias investigaciones *in vitro* e *in vivo* (**Fournomiti et al., 2015; Nebahat et al., 2010; Soto et al., 2006**). Algunos artículos reportan que la fuerte acción antimicrobiana del timol y carvacrol está asociada a la presencia del radical hidroxilo, debido a que el p-cimeno, precursor biológico de estos componentes, carece de este hidroxilo y presenta menor actividad (**López-Ambrocio et al., 2016**). Otros estudios señalan que al exponer las células bacterianas a concentraciones subletales de agentes antimicrobianos naturales (como el timol y carvacrol) producen cambios en la concentración de los ácidos grasos de la membrana celular, presentándose un aumento de los ácidos grasos insaturados (**García-García & Palou-García, 2008**). En la Fig. 2 se muestra como los componentes mayoritarios (timol y carvacrol) del aceite esencial de *T. vulgaris* interactúan con la membrana celular disolviéndose en la bicapa fosfolipídica, lo que causa la desestabilización de la misma, aumentando su fluidez y permeabilidad (**Parra-Sepúlveda, 2020**). La posición orto del radical hidroxilo del timol le permite actuar como intercambiador de protones. Inicialmente se difunde a través de la membrana hacia el citoplasma donde libera su protón, seguido a esto vuelve al exterior de la célula transportando y liberando un catión, y el carvacrol capta un nuevo catión repitiendo el ciclo, causado así disminución de ATP, deterioro de procesos vitales y finalmente la muerte de la célula bacteriana. (**López-Ambrocio et al., 2016**)



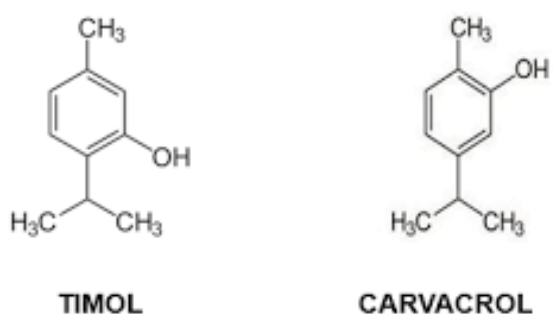


**Fig.2** Mecanismo de acción antimicrobiano reportado de timol y carvacrol, compuestos mayoritarios del aceite esencial de *T. vulgaris*,

Tomado de: **Parra-Sepúlveda. 2020.**

El timol es el principal fenol monoterpénico presente en el aceite esencial de *T. vulgaris*, con una concentración de hasta el 64% (**García-García & Palou-García, 2008; Marchese et al., 2016**). Posee un grupo fenólico con un alto poder hidrofóbico (**Fig. 3**). Su efecto podría deberse a la perturbación de las fracciones lipídicas de las membranas plasmáticas bacterianas por enlaces de hidrógeno, haciendo que las membranas y las mitocondrias sean más permeables y de esta forma poder desintegrarlas (**Di Pasqua et al., 2010; Anup-Kollanoor et al, 2010; Marchese et al., 2016; Trombetta et al., 2005**). Ha sido ampliamente utilizado en la mejora de la seguridad microbiana contra una variedad de patógenos, incluyendo *E. coli* (**Chien**

*et al.*, 2016). También se ha reportado que este compuesto inhibe el crecimiento de esporas (López-Ambrocio *et al.*, 2016).



**Fig. 3** Estructura química de timol y carvacrol.

Tomado de: (García-García & Palou-García, 2008).

Estudios han demostrado que el efecto del timol es mayor cuando se encuentra a un pH de 5.5 en comparación a un pH de 6.5, ya que a bajos valores de pH la molécula del agente antimicrobiano no está disociada, logrando unir mejor las partes hidrofóbicas de las proteínas, y por lo tanto facilitando la disolución de la fase lipídica de la membrana citoplasmática (García-García & Palou-García, 2008).

El carvacrol a pesar de no estar presente en altas concentraciones (2-11%) en la composición química del aceite esencial de *T. vulgaris*, ha sido reportado como uno de los responsables de la actividad antimicrobiana de este aceite esencial (García-García & Palou-García, 2008). Ha sido utilizado como aditivo alimentario en la industria de los alimentos durante mucho tiempo (Joca *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012). Además, diversos informes indicaron que no sólo tiene propiedades antimicrobianas si no también antimicóticas, antioxidantes y potenciales contra el cáncer (Gany &

**Mahdi 2008; Giweli et al., 2012; Jaafari et al., 2012).** El carvacrol es un monoterpeno que penetra fácilmente en las membranas celulares de las bacterias, provocando la alteración de la integridad de la membrana celular y la liberación de contenido de células bacterianas **(García-García & Palou-García, 2008; Magi et al., 2015).** La estructura química del carvacrol es similar a la del timol cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo **(Fig. 3).**

Estudios señalan que células de *E. coli* en presencia de carvacrol a una concentración de 1 mM no sintetiza flagelos, provocando que el microorganismo crezca sin movilidad, al verse estresada *E.coli* utiliza su energía en otras funciones vitales, en vez de sintetizar flagelos. Sin embargo, a una concentración de 5 mM cesa inmediatamente la movilidad y ocurre la muerte celular **(García-García & Palou-García, 2008).**

También se ha demostrado que el aceite esencial de *T. vulgaris*, así como timol y carvacrol, tienen un potente efecto antimicótico y antitumoral debido al daño mitocondrial **(Aydin et al., 2013; Kong et al., 2019; Nikolić et al., 2014; Ozkan & Erdogan, 2012).** Al desestabilizar la estructura de la membrana mitocondrial, genera permeabilidad anormal de radicales, citocromo c, iones de calcio y proteínas. Como resultado de estrés oxidativo y las fallas bioenergéticas, afecta la fuerza protón motriz, disminuyendo el potencial de membrana y así mismo se genera un daño al ciclo iónico de  $Ca^{2+}$  y otros canales iónicos, se reduce el gradiente de pH que afectan la bomba de protones y la reserva de ATP. También se ve alterado el transporte activo y la coagulación del contenido celular causando lisis y muerte celular **(Aguilar Castillo, 2016 Bakkali et al., 2008; Sánchez-Pérez et al., 2014).**

**AitM'barek et al., (2007)** reportaron que el aceite esencial de *T. vulgaris* tiene un importante efecto *in vitro* en la actividad citotóxica contra células tumorales. Existen múltiples ensayos en donde se reporta la actividad antiproliferativa de carvacrol hacia diferentes líneas carcinógenas, entre ellas, células MDA-MB 23 de cáncer de mama, A549 de carcinoma de pulmón, melanomas de ratón y Hep-G2 **(Arunasree, 2010; He et al., 1997; Sivas & Tomsuk 201; Yin et al., 2012). Jaafari et al., (2012)**

reportaron la actividad citotóxica de timol y carvacrol contra las líneas celulares tumorales P-815 (mastocitoma murino), K-562 (leucemia mielógena crónica humana), CEM (leucemia linfoblastoide aguda T) y MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano). En el estudio de **Suntres et al., (2015)** se reportó que el carvacrol indujo apoptosis asociada a la inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones, observándose otros cambios como la disminución del potencial mitocondrial en una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549), la liberación del citocromo c mitocondrial, la activación de caspasa, formación de ampollas citoplásmicas e irregularidad de la forma de la membrana mitocondrial.

Por otro lado, se demostró la actividad antimicótica por la combinación de timol y ácido salicílico, observándose una disminución de las actividades de succinato deshidrogenasa, málico deshidrogenasa, citrato sintetasa, isocitrato deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, inhibiendo así la vía tricarboxilica de las células de *Rhizopus stolonifer*. Estos fenómenos fueron atribuidos a la inhibición significativa de uno o más componentes de la cadena transportadora de electrones, disminuyendo tanto la síntesis de ATP como la generación de NADPH, y por lo tanto perjudicando el sistema antioxidante y daño a la función mitocondrial en las células de *R. stolonifer* (**Kong et al., 2019**).

### 3. Planteamiento del problema

Los aceites esenciales son de suma importancia para la industria farmacéutica y alimenticia ya que son una alternativa natural para la producción de antimicrobianos, pues se ha reportado que no generan resistencia microbiana como lo antibióticos, debido a sus múltiples sitios de acción. Para el caso de *T. vulgaris*, se ha reportado que afectan la permeabilidad de la membrana, sin embargo, su acción debe ir más allá de la membrana bacteriana ya que es un potente agente bactericida. Diversos estudios han descrito que aparte de la actividad antimicrobina del aceite esencial de *T. vulgaris*, presenta diversas funciones terapéuticas, entre ellas su capacidad antitumoral y antifúngica, en donde el mecanismo principal actúa directamente sobre las mitocondrias de líneas celulares cancerígenas y levaduras, alterando la fluidez de la membrana, produciendo la permeabilidad anormal de radicales, citocromo c, iones de calcio y proteínas como resultado de estrés oxidativo y fallas bioenergéticas. Por ello, en esta propuesta de trabajo se consideró la posibilidad de estudiar un nuevo mecanismo de acción del aceite esencial de *T. vulgaris* que inhiba la respiración a nivel de la cadena transportadora de electrones, usando a *E. coli* uropatógena como modelo de experimentación.

#### 4. Justificación

Se sabe que los aceites esenciales de diferentes plantas tienen actividad antimicrobiana. Estos aceites contienen diferentes sustancias volátiles. En donde se ha reportado que los fenoles (monoterpenos) son los responsables de conferirles la actividad bactericida. En este contexto, *T. vulgaris* es un potente inhibidor de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. El efecto antibacteriano del aceite esencial de *T. vulgaris* se ha atribuido exclusivamente a su capacidad para permeabilizar y despolarizar la membrana citoplasmática y como consecuencia la fuga de iones y contenido citoplasmático, dando paso a la lisis celular. Sin embargo, también se ha reportado que los aceites esenciales con actividad antimicrobiana pueden presentar varios mecanismos de acción, gracias a su amplia variedad de componentes. Lo antes mencionado le proporciona una potente actividad bactericida al aceite esencial de *T. vulgaris*, de igual forma evita que las bacterias generen resistencia a él, como el caso de los antibióticos. Sin embargo, no se tiene mucha información acerca del mecanismo de acción antimicrobiano de este aceite esencial. Con la realización del presente estudio se podrá aportar nueva información en torno a otros posibles sitios de acción, entre ellos la afectación en la cadena transportadora de electrones.

## 5. Hipótesis

**5.1 H1:** *T. vulgaris* tiene un efecto sobre la respiración de *E. coli* uropatógena.

**5.2 H0:** *T. vulgaris* no tiene un efecto sobre la respiración de *E. coli* uropatógena.

## **6. Objetivos**

### **6.1 Objetivo general:**

Determinar el efecto de *T. vulgaris* sobre la respiración de *E. coli* uropatógena.

### **6.2 Objetivos específicos:**

1. Probar el efecto de *T. vulgaris* sobre el crecimiento de *E. coli* uropatógena CFT 073.
2. Medir la tasa de respiración de *E. coli* uropatógena CFT 073 usando diferentes sustratos, y el efecto de la presencia de *T. vulgaris*.
3. Medir la tasa de respiración de células permeadas de *E. coli* uropatógena CFT 073, usando diferentes sustratos.



## **7. Metodología**

### **7.1 Material biológico y químico**

En este estudio se utilizó la cepa CFT 073 de *E. coli* uropatógena y aceite esencial de *T. vulgaris* de origen comercial.

### **7.2 Crecimiento de *E. coli* uropatógena**

Se empleó el medio de cultivo soya tripticaseína (ST) en placa y en caldo (conteniendo g/L: 15 g de hidrolizado pancreático de caseína, 5 g de hidrolizado papaínico de harina soya y 5 g de cloruro sódico). Se tomó una asada de un vial de *E. coli* uropatógena mantenida en congelación a -30°C, se colocó en 5 mL de caldo ST y se incubó 24 horas a 37°C bajo condiciones estacionarias. Posteriormente, se tomó una asada a partir del caldo ST con crecimiento y se sembró por estría cruzada en una placa de Petri conteniendo agar ST. La placa fue incubada a 37°C durante 24 horas. Para los ensayos de respiración, se partió de un precultivo de 24 horas de *E. coli* uropatógena en caldo ST. Luego, los tubos conteniendo 5 mL de caldo ST fueron inoculados con 100 µL del precultivo. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 horas.

### **7.3 Efecto de *T. vulgaris* sobre el crecimiento de *E. coli* uropatógena**

Se realizaron ensayos para probar la actividad de *T. vulgaris* utilizando la técnica de difusión en agar. Para ello, en placas de agar ST se colocaron 5 discos de papel filtro (de unos 5 mm de diámetro) en forma equidistante. Las placas fueron previamente inoculadas en césped con *E. coli* uropatógena a partir de un precultivo de 24 horas en caldo ST  $Ab_{560nm} = 2-3$ . Posteriormente, se adicionaron diferentes cantidades del aceite esencial de *T. vulgaris* en cada disco de papel filtro: 0.65 a 13 mg. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Después de este tiempo, se midieron los halos de inhibición del crecimiento. Como referencia, se realizó el mismo ensayo empleando diferentes cantidades de timol (0.53 a 10.6 mg), carvacrol (0.65 a 13 mg) y la mezcla 1:1 de ambos (0.45 a 9 mg).

Para ensayar con concentraciones mayores de timol, se utilizó la técnica de difusión en pozo, en donde se prepararon 2 placas de agar con el doble de medio de cultivo de ST (40 mL).

Una vez que gelifico el medio se inóculo con *E. coli* uropatógena, cada inoculo colocado en la placa contenía  $10^6$  bacterias, realizando un estriado masivo, para posteriormente realizar 5 perforaciones de manera equidistante, con una pipeta Pasteur. En cada pozo se le agregaron diferentes concentraciones de timol (13-143 mg).

#### **7.4 Determinación de la tasa de respiración de *E. coli* uropatógena usando diferentes sustratos y el efecto de la presencia de *T. vulgaris*.**

Para determinar la tasa de respiración de *E. coli* uropatógena se realizó un ensayo polarográfico usando un oxímetro provisto de un electrodo de Clark. De esta manera se determinó el consumo de oxígeno dentro de una cámara de registro (capacidad máxima de 6 mL. La mezcla de reacción contenía: 3 mL de solución reguladora de fosfatos 20 mM pH 7.0 y 1 mL de una suspensión de *E. coli* uropatógena de alta densidad celular ( $Ab_{560nm} = 2-3$ ). Cada registro se inició con la adición de 1 mL de sustrato (glucosa 0.4 M o succinato 0.4 M). y los registros de respiración se realizaron cada minuto durante 15 minutos, manteniendo una temperatura constante a 37°C. La suspensión de *E. coli* uropatógena se obtuvo partiendo de 1 mL de un precultivo de 24 horas a 37°C en 5 mL de caldo ST. Las células fueron lavadas 2 veces con 1 mL de solución reguladora de fosfatos 20 mM pH 7.0. Después fueron resuspendidas en 1 mL de la misma solución amortiguadora para realizar el ensayo. Los ensayos se repitieron por triplicado. Para determinar el efecto de *T. vulgaris* sobre la tasa de respiración de *E. coli* uropatógena, se realizaron los ensayos de respiración empleado las condiciones anteriores. Para eso, cada suspensión de *E. coli* uropatógena fue incubada a diferentes cantidades del aceite esencial: 260, 780, 1300 y 2600  $\mu$ g, durante 10 minutos a temperatura ambiente. La suspensión bacteriana fue colocada en la mezcla de reacción y se inició el registro con la adición de los sustratos correspondientes. Los registros de respiración se

realizaron cada minuto durante 15 minutos, manteniendo una temperatura constante a 37°C

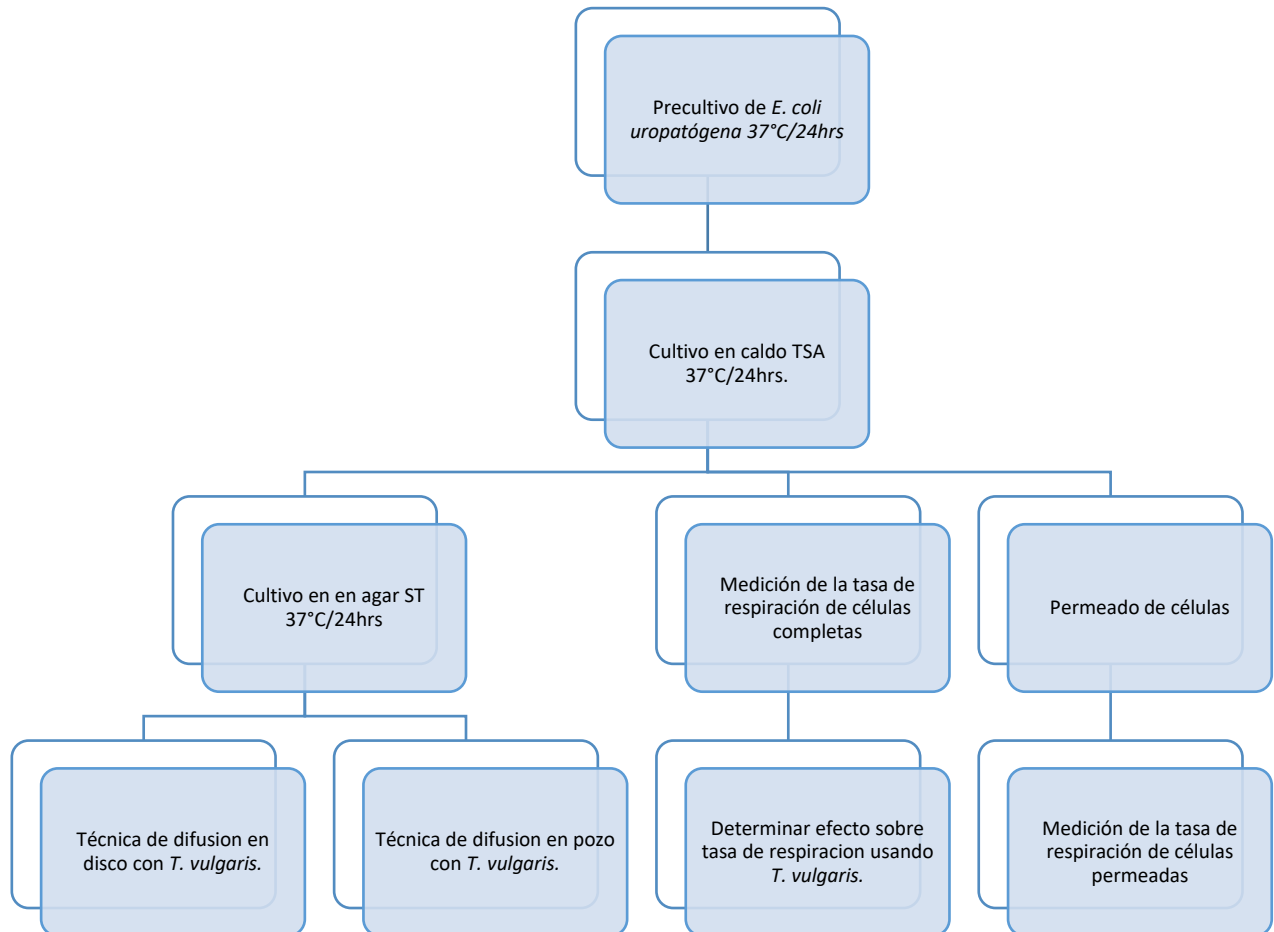
### **7.5 Permeado de células de *E. coli* uropatógena y determinación de la tasa de respiración**

Para obtener células permeadas de *E. coli* uropatógena, se realizó un cultivo en 5 mL de caldo ST a 37°C durante 24 horas. Para cada ensayo, se tomó 1 mL del cultivo y las células de *E. coli* uropatógena fueron lavadas dos veces con 1 mL de solución reguladora de fosfatos 20 mM pH 7.0. Luego, se adicionaron 450 µL de la solución anterior, 10 µL de Triton X100 y 40 µL de etanol absoluto. La mezcla fue agitada en el vórtex cada 5 min, durante 20 minutos. Al término, la mezcla fue lavada dos veces con 500 µL de solución reguladora de fosfatos 20 mM pH 7.0, se eliminó el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido en 1 mL de la misma solución para su uso en el ensayo de respiración.

### **7.6 Determinación de la tasa de respiración en células permeadas de *E. coli* uropatógena**

Para determinar la respiración en células permeadas de *E. coli* uropatógena, se realizó un ensayo polarográfico usando un oxímetro provisto de un electrodo de Clark como se mencionó anteriormente. En este caso, la mezcla de reacción contenía: 3 mL de solución reguladora de fosfatos 20 mM pH 7.0 y 1 mL de la suspensión de células permeadas de *E. coli* uropatógena. El registro de la respiración se inició con la adición de 1 mL de sustrato (glucosa 0.4 M o succinato 0.4 M). Los registros de la respiración fueron medidos cada minuto durante 15 minutos, manteniendo una temperatura constante a 37°C. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

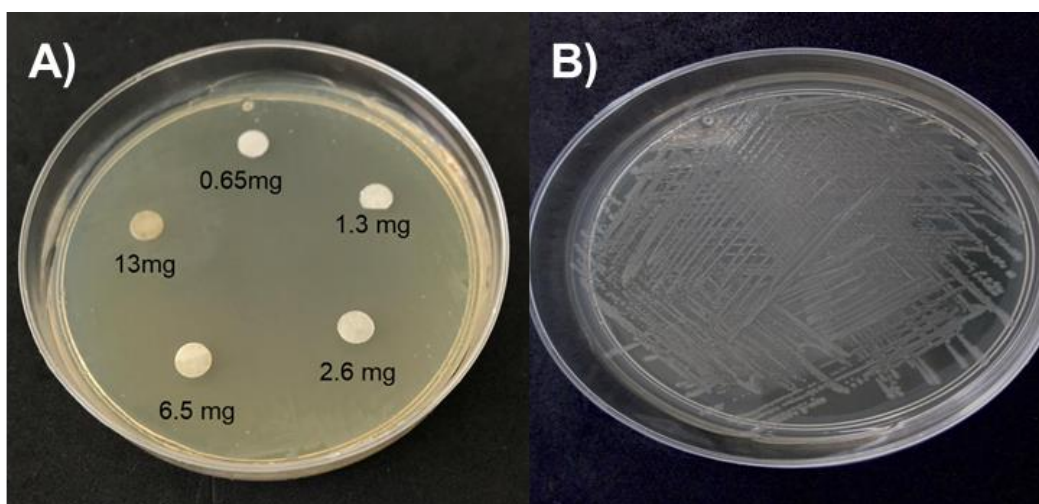
## 8. Esquema de trabajo



## 9. Resultados

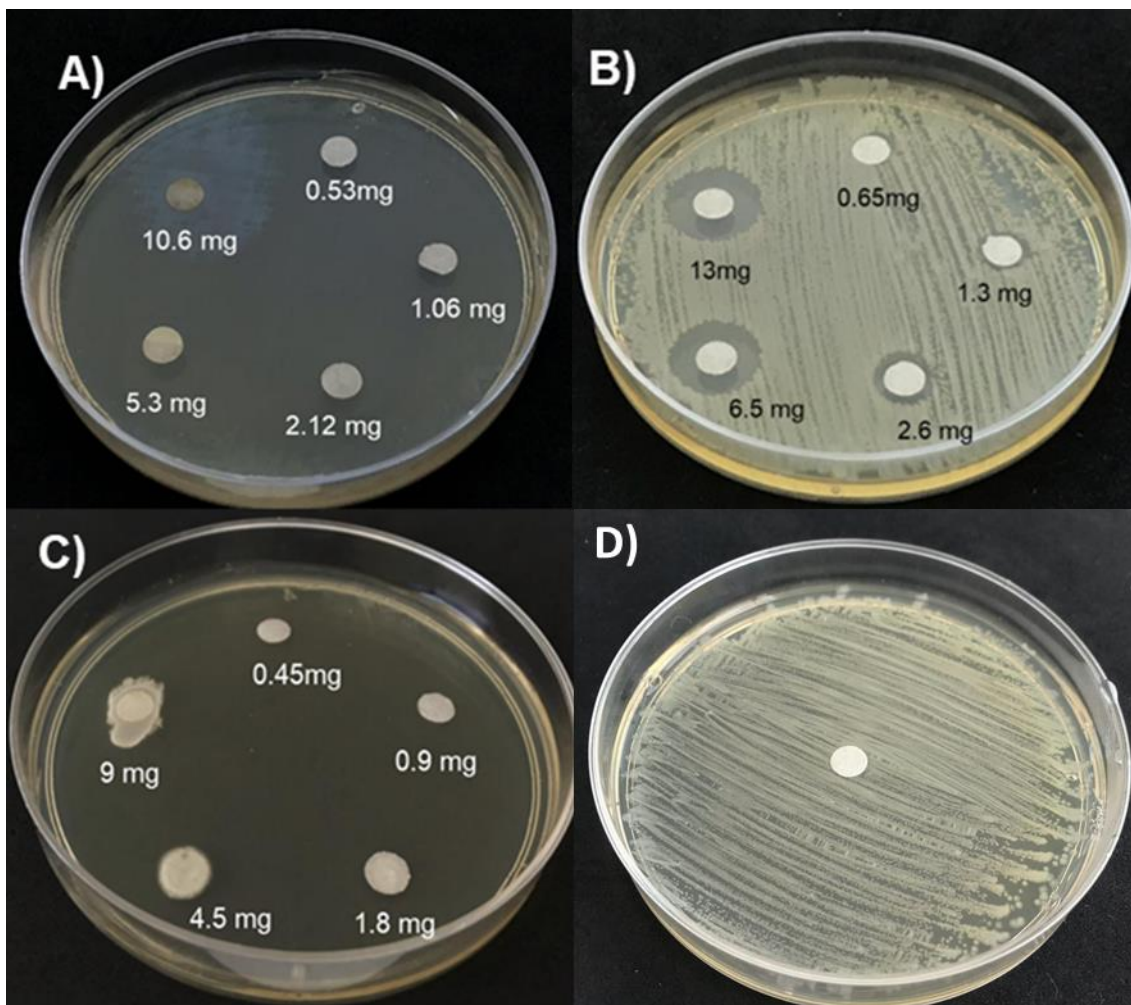
### 9.1. Efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* sobre el crecimiento de *E. coli* uropatógena

Con la finalidad de evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *T. vulgaris* sobre el crecimiento de *E. coli* uropatógena, se realizaron ensayos en placas de agar ST usando la técnica de difusión en disco. Los resultados se muestran en la **Fig. 4**. Como se puede observar en la **Fig. 4A**, hubo un efecto inhibitorio fuerte por parte del aceite esencial de *T. vulgaris* sobre el crecimiento de *E. coli* uropatógena. A las concentraciones ensayadas (0.65, 1.3, 2.6, 6.5 y 13 mg) se inhibió totalmente el crecimiento de la bacteria observándose una superficie totalmente libre de crecimiento bacteriano sobre el agar ST, a diferencia del crecimiento observado en la placa de ST mostrada en la **Fig. 4B** (condición control).



**Fig. 4** Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *T. vulgaris*, A. Inhibición del crecimiento de *E. coli* uropatógena usando diferentes cantidades de *T. vulgaris*. B. Condición control.

Usando la técnica de difusión en disco y en pozo y como una referencia, se realizaron ensayos empleando diferentes cantidades de timol, carvacrol y la mezcla de ellos (1:1) para determinar el efecto sobre el crecimiento de *E. coli* uropatógena. Los resultados se presentan en la **Fig. 5** y **Fig. 6**.



**Fig. 5** Actividad antimicrobiana de carvacrol y timol. A. Inhibición del crecimiento de *E. coli* uropatógena usando diferentes cantidades de carvacrol. B. Efecto de timol sobre el crecimiento de *E. coli* uropatógena. C. Inhibición del crecimiento de *E. coli* uropatógena empleando una mezcla 1:1 de carvacrol y timol. D. Condición control.

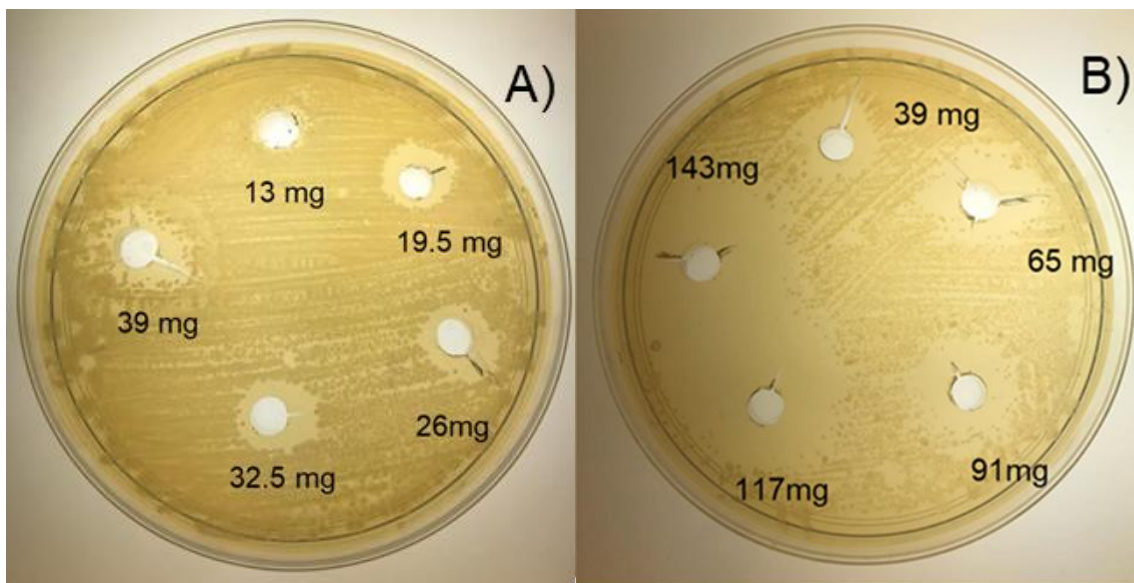
Como se puede observar en la **Fig. 5A**, el monoterpeno carvacrol mostró un efecto de inhibición del crecimiento de *E. coli* uropatógena, de forma similar a como se observó usando el aceite esencial de *T. vulgaris*. A todas las cantidades ensayadas de carvacrol (0.53, 1.06, 2.12, 5.3 y 10.6 mg) el crecimiento de la bacteria fue inhibido en su totalidad. En la **Fig. 5B** se puede observar que el monoterpeno timol

mostró resultados diferentes al inhibir en menor medida el crecimiento de *E. coli* uropatógena. Las cantidades ensayadas de timol fueron: 0.65, 1.3, 2.6, 6.5 y 13 mg. Como se observa en la imagen, el diámetro de los halos de inhibición fue incrementando progresivamente hasta alcanzar aproximadamente 16 mm en la mayor cantidad de timol ensayada. Lo anterior sugirió que al menos los monoterpenos carvacrol y timol son los responsables de la actividad antimicrobiana mostrada en *E. coli* uropatógena. Como se sabe el aceite esencial de *T. vulgaris* es una mezcla de componentes, por ello se preparó una mezcla de carvacrol y timol (1:1, v/v) y se colocaron diferentes cantidades en discos de papel para conocer su efecto sobre el crecimiento de *E. coli* uropatógena (**Fig. 5C**). Las concentraciones ensayadas de la mezcla 1:1 de carvacrol y timol fueron: 0.45, 0.9, 1.8, 4.5 y 9 mg. En la **Fig. 5C** se observa claramente el efecto inhibitorio en el crecimiento de *E. coli* uropatógena. Los resultados obtenidos fueron similares a los presentados ensayando con carvacrol (**Fig. 5A**), lo cual sugirió que este monoterpeno es el responsable de una mayor actividad antimicrobiana. Es importante mencionar que timol fue disuelto en dimetil sulfoxido (DMSO), por lo que se realizó una prueba de control impregnando un disco de papel con 10  $\mu$ L de DMSO para determinar el efecto del disolvente sobre el crecimiento de *E. coli* uropatógena (**Fig. 5D**). Como se puede observar en esta última sección imagen, DMSO no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de la bacteria.

Por otro lado, debido a que timol mostró un efecto inhibitorio de menor intensidad que carvacrol sobre el crecimiento de *E. coli* uropatógena, se realizaron ensayos de difusión en pozo usando cantidades mayores de timol. Las cantidades de timol ensayadas fueron: 13, 19.5, 26, 32.5, 39, 65, 91, 117 y 143 mg. Los resultados se muestran en la **Fig. 6**. Como se puede observar en las **Fig. 6A y Fig. 6B**, el efecto inhibitorio fue similar al observado al emplear cantidades menores de timol (**Fig. 5B**), lo que sugirió que este monoterpeno presenta poca actividad antimicrobiana, confirmando que al menos el carvacrol es el responsable del fuerte efecto inhibitorio del crecimiento observado en *E. coli* uropatógena. Es probable que esta menor



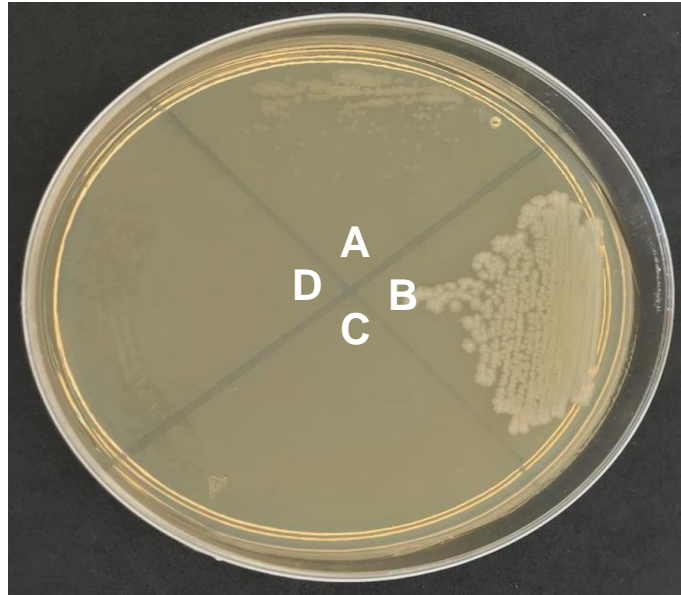
actividad antimicrobiana de timol pueda atribuirse a diferencias en la difusión del monoterpeno en el agar ST.



**Fig. 6** Efecto de timol en el crecimiento de *E. coli* uropatógena usando un ensayo de difusión en pozo. A. Cantidades de timol usadas: 13 a 39 mg. B. Cantidades de timol usadas: 9 a 143 mg.

Para determinar el efecto bacteriostático o bactericida de *T. vulgaris*, de timol y carvacrol, se realizó un cultivo en agar ST tomando como inóculo un raspado de las zonas que no mostraron crecimiento en los ensayos de difusión en agar con *T. vulgaris* y los monoterpenos (usando las mayores cantidades) e incubando a 37°C durante 24 horas. Los resultados se muestran en la **Fig. 7**. En el sector **A** se muestra el resultado obtenido después de resembrar una placa de agar ST, inoculando con el raspado tomado del ensayo usando carvacrol. Como se puede apreciar hubo poco crecimiento, sin embargo, en la placa de donde se tomó la asada, el crecimiento de *E. coli* uropatógena estaba totalmente inhibido (**Fig. 5A**). Este resultado sugirió que el carvacrol tuvo un efecto bacteriostático. En el sector **B** se muestra el resultado obtenido después de resembrar una placa de agar ST, inoculando con el raspado tomado del ensayo usando timol.





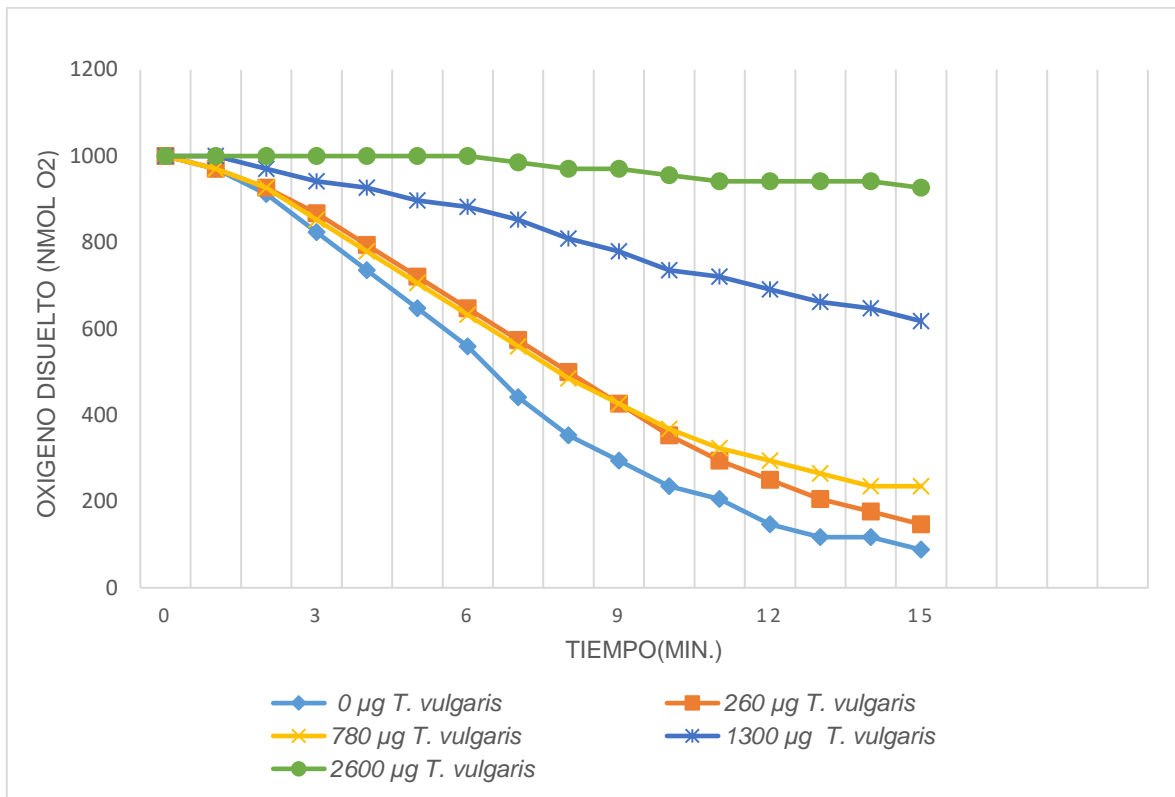
**Fig. 7** Efecto bactericida y bacteriostático de *T. vulgaris* y de los monoterpenos. A. Carvacrol. B. Timol. C. Mezcla timol-carvacrol (1:1, v/v). D. Aceite esencial de *T. vulgaris*.

En este caso, hubo abundante crecimiento de *E. coli* uropatógena. Se mostró anteriormente, que el timol tuvo una actividad antimicrobina menor que carvacrol, y por este ensayo también se muestra evidencia de un efecto bacteriostático. En el sector **C** se muestra el resultado obtenido después de resembrar una placa de agar ST, inoculando con el raspado tomado del ensayo usando una mezcla de timol y carvacrol. Como se puede apreciar no hubo crecimiento de *E. coli* uropatógena (fuerte inhibición del crecimiento). Este resultado permitió determinar que la combinación de estos dos monoterpenos tiene un efecto sinérgico, dando como resultado una actividad bactericida. Este resultado estuvo de acuerdo con lo mostrado en el sector **D** de la **Fig. 7** donde no hubo crecimiento de *E. coli* uropatógena después de tomar un raspado a partir de la placa tratada con *T. vulgaris* (**Fig. 4A**). Como se sabe, el aceite esencial de *T. vulgaris* contiene carvacrol

y timol por lo que estos compuestos deben ser los responsables del efecto bactericida observado.

## **9.2. Tasas de respiración de *E. coli* uropatógena usando diferentes sustratos y el efecto del aceite esencial de *T. vulgaris***

Las tasas de respiración de *E. coli* uropatógena y el efecto del aceite esencia de *T. vulgaris* fueron determinadas a través del consumo de oxígeno disuelto, usando un oxímetro provisto con un electrodo de Clark. Glucosa y succinato fueron empleados como sustratos y se siguió la metodología descrita en la sección correspondiente. En la **Fig. 8** se muestran las tasas de respiración obtenidas usando glucosa como sustrato en presencia de diferentes cantidades del aceite esencial: 0, 260, 780, 1300 y 2600  $\mu\text{g}$ . Como se puede observar, al incrementar la cantidad de *T. vulgaris* las tasas de respiración van disminuyendo. Las tasas de respiración obtenidas se muestran en la **Tabla 3**. A continuación se muestra que *E. coli* uropatógena consumió  $88 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1}$  en ausencia de *T. vulgaris*, en tanto que con 260  $\mu\text{g}$  de *T. vulgaris* la tasa de respiración fue de  $70.2 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1}$ , con 780  $\mu\text{g}$  de *T. vulgaris* la tasa de respiración fue de  $69.8 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1}$ , con 1300  $\mu\text{g}$  de *T. vulgaris* la tasa de respiración fue de  $26.9 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1}$  y con 2600  $\mu\text{g}$  de *T. vulgaris* la tasa de respiración fue de  $0 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1}$ . Con estas cantidades del aceite esencial la actividad respiratoria de *E. coli* uropatógena se inhibió en un 20% usando 260  $\mu\text{g}$  y en un 70% usando 1300  $\mu\text{g}$ .

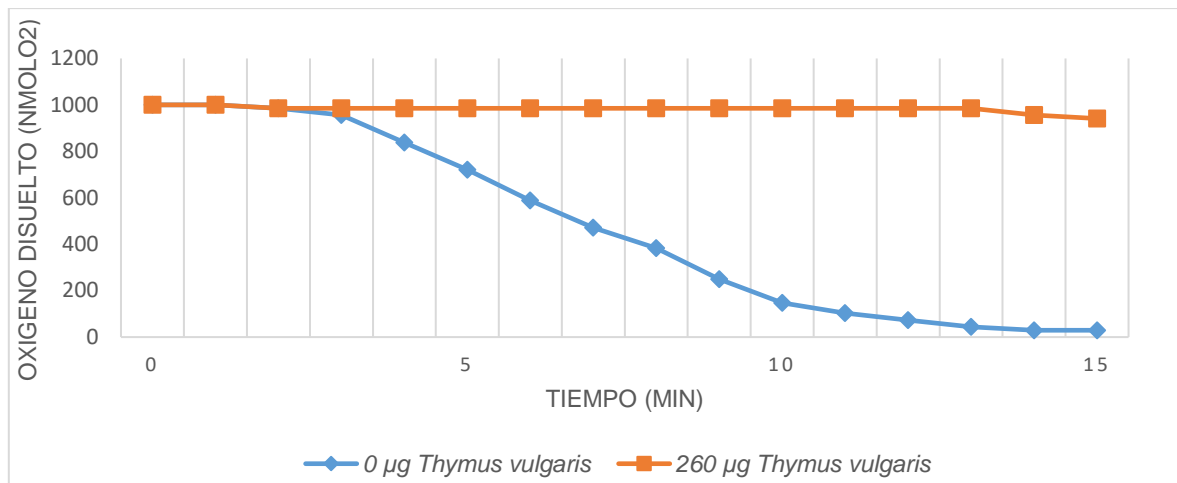


**Fig. 8** Tasas de respiración de *E. coli* uropatógena en presencia del aceite esencial de *T. vulgaris*.

**Tabla 3.** Actividad respiratoria de *E. coli* uropatógena usando glucosa como sustrato.

Cantidad ensayada de aceite esencial (µg)	Actividad respiratoria (nmol O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup> )	Actividad respiratoria relativa (%)
0	88	100
260	70.2	80
780	69.8	80
1300	26.9	30.6
2600	0	0

En la **Fig. 9** se muestran las tasas de respiración obtenidas usando succinato como sustrato en presencia de diferentes cantidades del aceite esencial: 0 y 260  $\mu\text{g}$ . Como se puede observar con 260  $\mu\text{g}$  de *T. vulgaris* la tasa de respiración disminuyó en su totalidad. La tasa de respiración obtenida en ausencia de *T. vulgaris* fue de 115  $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1}$ .



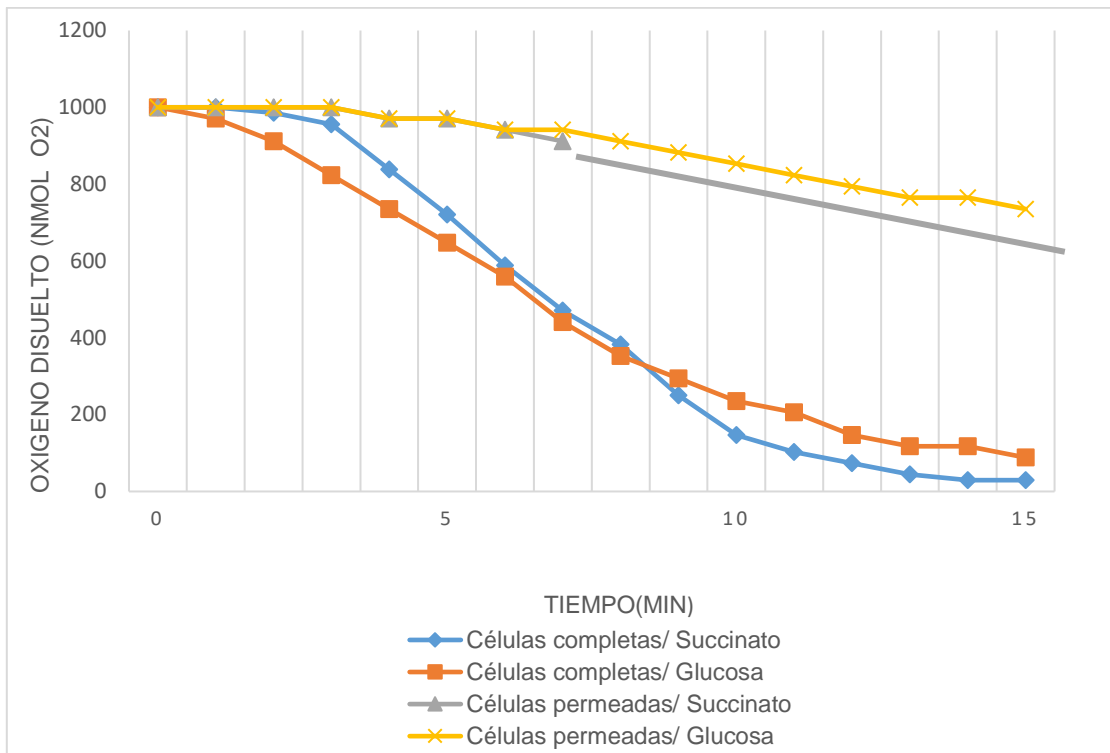
**Fig. 9** Tasas de respiración de *E. coli* uropatógena usando succinato como sustrato en presencia de *T. vulgaris*.

Como se pudo observar, la inhibición de la actividad respiratoria de *E. coli* uropatógena se produjo en presencia de *T. vulgaris*, sin embargo el comportamiento fue diferente al emplear glucosa y succinato como sustratos. Así, cuando se emplearon 260  $\mu\text{g}$  de *T. vulgaris* la actividad respiratoria decayó en un 20% usando glucosa como sustrato, en tanto que usando la misma cantidad del aceite esencial y succinato como sustrato, la actividad respiratoria se perdió en su totalidad. Los datos anteriores sugirieron que *T. vulgaris* inhibe la actividad respiratoria de la bacteria y que actúa probablemente en sitios diferentes.

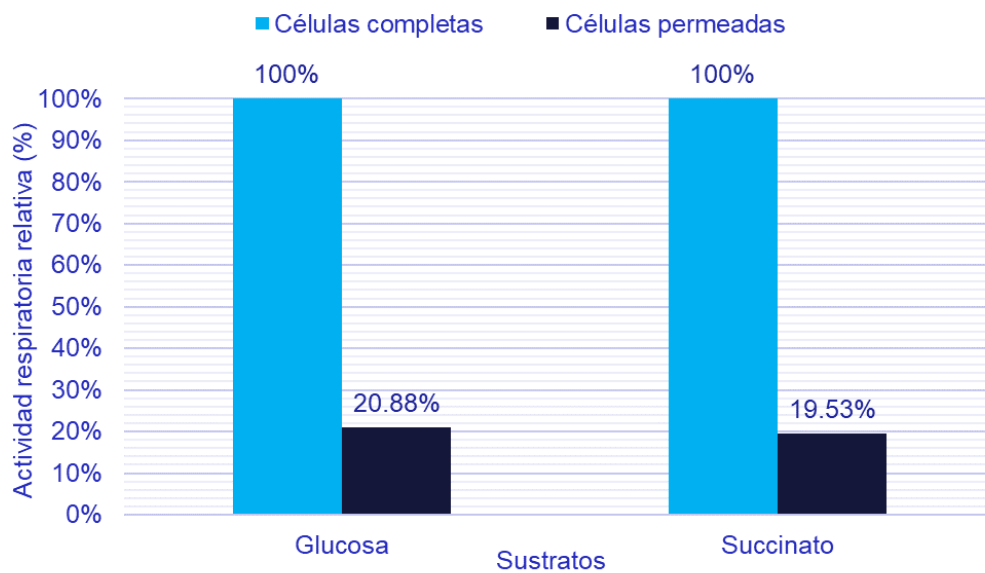
### 9.3 Tasas de respiración en células permeadas de *E. coli* uropatógena

Estudios previos han reportado que el mecanismo responsable de la actividad antimicrobiana de *T. vulgaris* es la alteración de la permeabilidad de la membrana

(generando poros). Con el fin de generar poros en las membranas y conocer su cinética de respiración, células de *E. coli* uropatógena fueron permeadas utilizando una solución que contenía etanol y Triton X-100 a bajas concentraciones como se describió en la sección de Metodología. Una vez obtenidas las células permeadas de *E. coli* uropatógena se realizaron los ensayos de respiración. Los resultados se muestran en la **Fig. 10**. Como se puede observar en la **Fig. 10** y **Fig. 11**, las tasas de respiración de las células permeadas disminuyeron aproximadamente 5 veces, mostrando el mismo efecto al emplear glucosa y succinato como sustratos. Así los valores de las tasas de respiración de *E. coli* uropatógena fueron de  $18.37 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1}$  (actividad relativa: 20.88%) y de  $22.45 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1}$  (actividad relativa: 19.53%), respectivamente. Ya que la formación de poros en *E. coli* uropatógena permitió aún registrar actividad respiratoria, se propuso que la alteración de la membrana no es la única causa del cese total en el consumo de oxígeno y que muy probablemente, *T. vulgaris* afecta algún componente del sistema respiratorio de *E. coli* uropatógena. Una prueba de ello fue cuando se adicionó *T. vulgaris* a las células permeadas (con un remanente del 20% de actividad) observando la caída total de la actividad respiratoria, usando glucosa y succinato como sustratos (datos no mostrados).



**Fig. 10** Ensayo de respiración en células permeadas de *E. coli* uropatógena.



**Fig. 11** Actividad respiratoria relativa de células permeadas y células no tratadas de *E. coli* uropatógena empleando diferentes sustratos.

## 10. Discusión

El mecanismo de acción de los aceites esenciales y sus componentes como antimicrobianos no ha sido completamente aclarado. Esto se complica por el hecho de que hay una gran cantidad de sustancias químicas presentes en los aceites esenciales y, a menudo, todos son necesarios para la actividad antibacteriana. Así, el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales puede no ser atribuible a un solo mecanismo de acción específico, sino que pueden presentar múltiples objetivos en la bacteria **(Pino-Pérez et al., 2012)**

La mayor parte del enfoque en los mecanismos antimicrobianos para los aceites esenciales se ha centrado en la membrana celular y objetivos interconectados con la membrana **(Chiasson et al., 2004; García-García & Palou-García, 2008)**. Los aceites esenciales pasan a través de la pared celular y la membrana citoplasmática, incrementando la permeabilidad, causando pérdidas de ATP, fuga de iones y, por último, lisis celular **(Bakkali et al., 2008; Di Pascua et al., 2010)**. Tal es el caso para *T. vulgaris*, que es reportado como un potente antimicrobiano y su único mecanismo de acción hasta ahora es la alteración de la membrana citoplasmática **(García-García & Palou-García, 2008; Magi et al., 2015)**. Sin embargo, en este trabajo se propuso un mecanismo de acción alternativo, en donde el aceite esencial interviene en la actividad respiratoria, alterando el consumo de oxígeno en la bacteria ensayada y produciendo una afectación en alguno de los componentes de la cadena transportadora de electrones.

La actividad antibacteriana se probó por el método de difusión en placa usando discos de papel y en pozo. Los resultados se mostraron en las **Fig. 4, 5, 6 y 7**. El aceite esencial de *T. vulgaris* mostró una fuerte actividad bactericida frente a *E. coli* uropatógena CFT073 a una cantidad de 0.65 mg **(Fig. 4)**, puesto que al realizarse un resembrado de la placa no se generó crecimiento alguno de *E. coli* uropatógena **(Fig. 7)**. Así mismo como complemento se evaluó la actividad antimicrobiana de Timol y carvacrol. Se observó que ambos monoterpenos afectan el crecimiento de *E. coli* uropatógena, sin embargo, timol presenta una menor capacidad para inhibir su

crecimiento puesto que solo genero pequeños halos de inhibición, aun usando concentraciones muy elevada (143mg) (**Fig. 6**). En cambio, carvacrol tiene una mayor capacidad antimicrobiana pues inhibió el crecimiento totalmente desde 0.53 mg (**Fig.5**). Posteriormente se realizó un resembrado (**Fig.7**) de ambas placas y pudimos observar que en cada caso se generó un crecimiento de *E. coli* uropatógena, el en caso de timol fue más abundante el crecimiento. Con estos resultados determinamos que ambos presentan actividad antimicrobiana de tipo bacteriostática, siendo más fuerte la de carvacrol, lo cual concuerda con los datos reportados por (**Hattabi et al. 2016; Gallegos et al. 2019**), los factores que pudieron influir fueron los métodos utilizados para evaluar la actividad antibacteriana, así como la elección de cepas bacterianas y su sensibilidad; el volumen de inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y pH. Por otro lado, un estudio hecho por (**Santurio et al. 2014**) mostró que el aceite esencial de *T. vulgaris* y su compuesto mayoritario timol, mostraron actividades bacteriostáticas y bactericidas contra cepas de *E. coli* in vitro. No obstante, la actividad del aceite esencial fue superior al compuesto solo.

Como sabemos el aceite esencial de *T. vulgaris* es una mezcla de compuestos y entre ellos se encuentran timol y carvacrol en diferentes proporciones por lo cual también se evaluó la actividad antimicrobiana de la mezcla 1:1 de timol-carvacrol (**Fig. 5**) y se observó que inhibe el crecimiento desde 0.45 mg. Al igual que los casos anteriores se realizó un resembrado de la placa y en la **Fig. 7** observamos que no hay crecimiento de *E. coli* uropatógena, con esto podemos determinar que combinación de timol y carvacrol presentan sinergismo en su capacidad antimicrobiana, dando como resultado una actividad bactericida. El conjunto de estos resultados nos reafirma que el aceite esencial de *T. vulgaris* es un poderoso antimicrobiano y por ende se considera que no presenta solo un mecanismo de acción antimicrobiano.

Además, este resultado concuerda con lo reportad por (**Guarda et al.,2011**), quienes nos dicen que la combinación de timol y carvacrol tiene un efecto



antimicrobiano sinérgico contra *Escherichia coli* O157: H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger*, y el mayor sinergismo se logró a una concentración de 50% de timol y 50% de carvacrol.

Cabe mencionar que el aceite esencia de *T. vulgaris*, además de ser un potente antimicrobiano tiene propiedades antitumorales y antimicóticas, en donde se ha reportado que el daño mitocondrial es uno de los mecanismos de acción, produciendo falla bioenergéticas (Aydin *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2019; Ozkan & Erdogan, 2012). Lo antes mencionado nos da indicios a creer que se podría generar un daño en similar hacia *E. coli* uropatógena, como consecuencia de la alteración de algún componente de la cadena transportadora de electrones al agregar el aceite esencial de *T. vulgaris*, hasta el momento no hay reportes sobre este mecanismo de acción antimicrobiano por parte del aceite esencial de *T. vulgaris*. Sin embargo, para generar evidencia al respecto, en este trabajo decidimos evaluar la actividad respiratoria de *E. coli* uropatógena en presencia del aceite esencial de *T. vulgaris*, usando glucosa y succinato como donador de electrones.

Como resultado obtuvimos la inhibición total del consumo de oxígeno al agregar 2600 µg/mL del aceite esencial de *T. vulgaris* cuando se usa glucosa como donador de electrones (Fig. 8) y una inhibición total al agregar 260 µg del aceite esencial de *T. vulgaris* cuando se usa succinato (Fig. 9). Es decir, el efecto fue 10 veces mayor cuando se usó succinato como única fuente de energía. Como sabemos el succinato es un sustrato actúa como donador de electrones directamente en la cadena transportadora de electrones, en el complejo dos. En cambio, la glucosa tiene que pasar por diferentes vías metabólicas para obtener los sustratos que se utilizaran en la cadena transportadora de electrones, y ser utilizados en algunos de los dos complejos de dicha cadena. Dicho lo anterior podemos sustentar la teoría de que el aceite esencial de *T.vulgaris* genera algún daño en el complejo dos de la cadena transportadora de electrones. Puesto que cuando se utilizó succinato como donador de electrones y se le agrego el aceite esencial, al estar dañado el complejo dos, la

actividad respiratoria se detuvo mucho más rápido y con una cantidad menor del aceite esencial de *T. vulgaris*.

El único mecanismo de acción antimicrobiana reportado hasta ahora por parte del aceite esencial de *T. vulgaris* es que altera la permeabilidad de las membranas bacterianas por ello, en este trabajo se alteró la permeabilidad generando poros en las membranas de *E. coli* uropatógena de manera artificial y se midió el consumo de oxígeno (**Fig. 10**), dando como resultado una disminución del consumo de oxígeno, sin embargo, no fue suficiente para provocar un cese total, si no solo del 80% (**Fig. 11**). Por lo tanto, esta es una evidencia contundente para determinar que la presencia de poros en la membrana a causa de *T. vulgaris*, no es el mecanismo de acción principal que le confiere su actividad antimicrobiana.

Con todos los resultados anteriores podemos concluir que el aceite esencial de *T. vulgaris* es un potente antimicrobiano de tipo bactericida que detiene por completo la actividad respiratoria de *E. coli* uropatógena. Nuestros resultados nos indican que existe otro mecanismo de acción principal causado por el aceite esencial de *T. vulgaris*, considerando un posible daño en la succinato deshidrogenasa que es un componente de la cadena transportadora de electrones.

## 11. Bibliografía

1. Aljabeili S., Barakat H., & Abdel-Rahman A. (2018). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*). *Food and nutrition sciences*, 9(1), 433-446.
2. Aguilar-Castillo, K. P. (2016). Efecto sinérgico antifúngico del aceite esencial de canela *Cinnamomum verum* solo y acompañado con ketoconazol en cepas de *Calbicans*. (Tesis de pregrado). Universidad César Vallejo, Trujillo, Perú.
3. Anup-Kollanoor, J., Darre, M., Donoghue, A., Donoghue, D., & Venkitanarayanan, K. (2010). Efecto antibacteriano de trans-cinamaldehído, eugenol, carvacrol y timol en *Salmonella enteritidis* y *Campylobacter jejuni* en contenido cecal de pollo in vitro. *poultry science association*, 19(3), 237-244.
4. Arunasree KM. (2010). Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB. *Phytomedicine*, 17 (8), 581-588.
5. Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance*, 11(1), 1645–1658.
6. Augustin J.M., Kuzina V., Andersen S.B., Bak S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72(6), 435-457.
7. Ávalos-García, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Serie fisiología vegetal*, 2(3) 119-145.

8. Aydın, E., Türkez, H., & Keleş, M. S. (2013). The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical, anticancerogenicity and genotoxicity studies. *Cytotechnology*, 66(1), 149-157.
9. Aziz, Z., Ahmad, A., Setapar, S., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah, M., Ganash, M., Kamal, M. A., & Ashraf, G. M. (2018). Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. *Current drug metabolism*, 19(13), 1100–1110.
10. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food and chemical toxicology*, 46 (2), 446-475.
11. Bassolé, I. H., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989–4006.
12. Benameur, Q., Gervasi, T., Pellizzeri, V., Pluchtová, M., Tali-Maama, H., Assaous, F., Ben-Mahdi, M.H. (2018). Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla<sub>ESBL</sub> producing multidrug resistant *Enterobacteriaceae* isolates. *Natural product research*, 32(18) 1–8.
13. Borboa, J., Rueda, E., Acedo, E., Ponce, J., Cruz, M., García, J., & Ortega, M. (2010). Evaluation of antibacterial activity in vitro of essential oils vs *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 12(3), 539 - 547.
14. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3): 223-253
15. Cañigueral, S. & Vila, R. (2007). Los aceites esenciales en fitoterapia. *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 6(5), 146.

16. Carmona A. J. C. (2007). Efecto de la utilización de arboreas y arbustivas forrajeras sobre la dinámica digestiva en bovinos. *Revista lasallista de investigación*, 4(1), 40-50.
17. Castaño, H., Ciro, G., Zapata-Montoya, J., & Jiménez, S. (2009). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Revista de la facultad quimica farmaceutica*, 17(2), 149-154.
18. Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. *Agronomía Colombiana*, 26 (1), 97-106.
19. Chávez-Jacobo, V. M. (2020). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: Un problema de salud pública sin ESKAPE. *Milenaria, ciencia y arte*, 9(15) 6-8
20. Chiasson F., Borsa J., Ouattara B., Lacroix M. (2004). Radiosensitization of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhi* in ground beef. *Diario de protección alimentaria*, 67(6), 1157-1162.
21. Chien, S. Y., Sheen S., Sommers C. H., Sheen L. Y., (2016). Modeling the inactivation of intestinal pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 and uropathogenic *E. coli* in ground chicken by high pressure processing and thymol. *Frontiers in microbiology*, 7(920), 1-11.
22. Da Rocha, R. P., Melo, E. C., Corbín, J. B., Berbert, P. A., Donzeles, S. M. L., & Tabar J. A. (2012). Cinética del secado de tomillo. *Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental*, 16(6), 675–683.
23. Dreser, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K., & Echániz, G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Pública de México*, 50( 4), 480-487.

24. Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2007). Toxicidad de membrana de compuestos antimicrobianos de aceites esenciales. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(1) 4863-4870.
25. Domingo D., López-Brea M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista española de quimioterapia*. 16(4), 385- 393.
26. Ekor M. (2014). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, 4(177), 1-10.
27. Elnaiem, M., Linda, S., Ibrahim, F., Alrhman, A., Bakrudeen, A., Bakrudeen A., & Rosna, T. (2015). Essential oil compositions and cytotoxicity from various organs of *Eucalyptus camaldulensis*. *International journal of agriculture and biology*, 17(2), 1560-8530.
28. Espinosa-Castaño, I., Báez-Arias, M., Hernández-Fillor, R. E., López-Dorta, Y., Lobo-Rivero, E., & Corona-González, B. (2019). Resistencia antimicrobiana en bacterias de origen animal: desafíos para su contención desde el laboratorio. *Revista de salud animal*, 41(3), 1-19)
29. Flores-Encarnación, M., Nava-Nolazco, R., Carreño-López, R., Aguilar-Gutiérrez, G., García-García, S., & Cabrera-Maldonado, C. (2016). The antibacterial effect of plant-based essential oils. *International journal of research studies in biosciences*, 4(12) 1-6.
30. Figueiredo, C., Barroso, J., Pedro, L., & Scheffer, J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and fragrance journal*, 23 (84), 213-226.
31. Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in food science & technology*, 19 (3) 156-164.

32. Fournomiti, M., Kimbaris, A., Mantzourani, I., Plessas, S., Theodoridou, I., Papaemmanouil, V., Alexopoul, A. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial ecology in health and disease*, 26 (1), 1-7.
33. Gallegos, P., Bañuelos, R., Delgadillo, L., Meza, C., & Echavarría, F. (2019). Antibacterial activity of five terpenoid compounds: carvacrol, limonene, linalool,  $\alpha$ -terpinene and thymol. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 22 (2) 241-248.
34. Gany Z., & Mahdi M. (2008) Cytotoxic assay of *Nigella sativa* leaf callus extract (thymol) on hep-2 cell line using ELISA assay. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17 (2), 63–67
35. García, C., Martínez, A., Ortega, J., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química viva*, 2 (1), 86-96.
36. García-García, R., & Palou-García, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés alimenticio. *Temas selectos de ingeniería en alimentos*, 2 (2), 41-51.
37. Giweli A., Dz̄amic' A., Sokovic' M., Ristic' M., Marin P. (2012) Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra* growing wild in Libya. *Molecules* 17(5), 4836–4850.
38. Gumus, T., Albayrak, S., Sagdic, O., Arici, M. (2011). Effect of gamma irradiation on total phenolic contents and antioxidant activities of *Satureja hortensis*, *Thymus vulgaris*, and *Thymbra spicata* from Turkey. *International journal of food properties*, 14(4), 830–839.

39. Hattabi L. E., Talbaoui A., Amzazi S., Bakri Y., Harhar H., Costa J., Desjobert J. M., Tabyaoui M. (2016) Chemical composition and antibacterial activity of three essential oils from south of Morocco. (*Thymus saturooides*, *Thymus vulgaris* and *Chamaelum nobilis*. *Journal of materials and environmental science*, 7(9), 3110-3117.
40. He, L., Mo, H., Hadisusilo, S., Qureshi, A., Elson, C. (1997) Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. *The journal of nutrition* 127(5), 668-674.
41. Holley, R., & Patel, D. (2005). Mejora en la vida útil y la seguridad de los alimentos perecederos por los aceites esenciales de plantas y los antimicrobianos de humo. *Microbiología de alimentos*, 22 (4), 273-292.
42. Isaza M. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et technica*. 33(1), 13-18.
43. Jaafari A., Tilaoui M., Mouse H., Mbark L., Aboufatima R., Chait A., Lepoivre M., Ziad A. (2012) Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2 (3), 534-540.
44. Jafri, H., & Ahmad, I. (2020). *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal de mycologie médicale*, 30 (1), 1-10.
45. Joca H., Cruz-Mendes Y, Oliveira-Abreu K, Maia-Joca R., Barbosa R, Lemos T., Lacerda Beirão P., Leal-Cardoso J. (2012) Carvacrol decreases neuronal excitability by inhibition of voltage-gated sodium channels. *Journal Natural Products*, 75 (9), 1511–1517.
46. Jiménez-García, A., & Zambrano-Gutiérrez M. (2016) Antibacterial effect of white and purple *Allium sativum* (garlic) extract, and 0.12%



Chlorhexidine Streptococcus mutans strains. *Revista científica dominio de la ciencia*, 3 (1) 234-247.

47. Karunamoorthi, K., Jegajeevanram, K., Vijayalakshmi, J., & Mengistie, E. (2013). Traditional medicinal plants: a source of phytotherapeutic modality in resource-constrained health care settings. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 18(1), 67–74.
48. Kong, J., Zhang, Y., Ju, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Quek, S., & Yao, W. (2019). Antifungal effects of thymol and salicylic acid on cell membrane and mitochondria of *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of tomatoes. *Food Chemistry*, 285 (1), 380-388.
49. León-Mendoza, C. (2017) Determinación de la acción antifúngica de los aceites esenciales de pimienta negra (*Piper nigrum*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y orégano (*Origanum vulgare*) sobre hongos postcosecha en ají paprika (*Capsicum annum l.*) (Tesis de pregrado) Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.
50. López-Ambrocio, R., Ruiz-Posada, L., & Delgadillo-Martinez, J. (2016). Anti-microbial activity of Thyme essential oil (*Thymus vulgaris L.*). *Agroproductividad*, 9(11), 78-82.
51. Magi, G., Marini, E., & Facinelli, B. (2015). Actividad antimicrobiana de aceites esenciales y carvacrol, y sinergia de carvacrol y eritromicina, contra *Streptococos* del grupo a resistentes a la eritromicina clínica. *Frontier in microbiology*, 6 (165), 1-7.
52. Marchese, A., Orhan, I., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S., Mohammad, S. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *Food chemistry*, 2010 (1) 410-414.

53. Montero-Recalde, M., Morocho-Núñez, M. J., Avilés-Esquivel, D., Carrasco-Cando, A., Erazo-Gutierrez, R. (2019) Antimicrobial efficacy of eucalyptus essential oil (*Eucalyptus* spp) on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* subsp. aureus strains. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 30 (2) 932-938.
54. Morales Vergara, S. A. (2018). Actividad ansiolítica del extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* (Tomillo) en *Rattus norvegicus*. *Revista peruana de medicina integrativa*, 3 (2), 85-90.
55. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6 (12) 1451-1474.
56. Nebahat, B., Vatanserver, L., Duman, B., & Sezer, Ç. (2010). Effect of oregano essential oil on biofilms formed by *Staphylococci* and *Escherichia coli*. *Kafkas Üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 16, 23-29.
57. Nickavar, B.; Mojab, F.; Dolat-Abadi, R. (2005) Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food chemistry*, 90(4), 609–611.
58. Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I., Calhelha, R., Fernandes, A., Marković, T., Marković, D., Giweli, A., Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial crops and products*, 52 (1), 183-190.
59. Numpaque, M., & Oviedo, L. (2011). Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. *Tropical plant pathology*, 36 (1), 1-11.
60. O'Bryan, C., Pendleton, S., Crandall, P., & Ricke, S. (2015). Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture- in vitro

studies on antibacterial mode of action. *Frontiers in veterinary science*, 2 (35), 1-8.

61. Ortega-Nieblas, M., Robles-Burgueño, M., Acedo-Félix, E., González-León, A., Morales-Trejo, A., & Vázquez-Moreno, L. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of oregano (*Lippia palmeri* S. WATS) essential oil. *Revista fitotecnica mexicana*, 34 (1), 11-17.
62. Ozkan, A., & Erdogan, A. (2012). A comparative study of the antioxidant/prooxidant effects of carvacrol and thymol at various concentrations on membrane and DNA of parental and drug resistant h1299 cells, *Natural Product Communications*, 7(12), 1157-1160.
63. Palhares, R. M., Gonçalves Drummond, M., Dos Santos Alves Figueiredo Brasil, B., Pereira Cosenza, G., das Graças Lins Brandão, M., & Oliveira, G. (2015). Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. *PloS one*, 10(5), 1-29.
64. 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.
65. Pérez-Delgado, Orlando. (2019). Resistencia antimicrobiana y nuevos principios bioactivos. *Journal of the selva andina research society*, 10(1), 1-3.
66. Pino-Pérez, O., Sánchez-Pérez, Y., Rojas, M., Abreu-Machado, Y., & Correa-Vidal, T. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from *Pimpinella anisum* L. *Revista de protección vegetal*, 27(3) 181-187.

67. Prestinaci, F., Pezzotti, P., Panstoni, A. (2015) Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog glob health*, 109(7), 309-318.
68. Rodríguez, N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable*, 7(1) 1-19.
69. Rubiolo, P., B. Liberto, E., Cordero, C., & Bicchi, C. (2010) Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. *Flavour and fragrance journal*, 25(5), 282-290.
70. Sánchez-Pérez, Y., Correa-Vidal, T., Abreu-Machado, Y., Cotilla-Pelier, L., Berroa-Navarro, G., and Pino-Pérez, O. (2014). Chemical composition of the essential oil of *Piper hispidum* Sw. and antibacterial activity against *Xanthomonas albilineans* Ashby Dowson and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson. *Revista de protección vegetal*, 29(3), 185–191.
71. Sánchez-Pérez, Y., Correa-Vidal, T. Abreu-Machado, Y., & Pino-Pérez, O. (2012). Effect of the essential oil of *Piper marginatum* Jacq. and its components on *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson. *Revista de protección vegetal*, 27(1) 39-44.
72. Santurio, D., Kunz de Jesus, F., Zanette, R., Schlemmer, K., & Fraton, A. (2014). Antimicrobial activity of the essential oil of thyme and of thymol against *Escherichia coli* strains. *Acta scientiae veterinari*, 42(1) 1-4.
73. Sivas, H., & Tomsuk O. (2011) Antiproliferative and apoptotic effects of the essential oil of *Origanum onites* and carvacrol on Hep-G2 cells. *Anadolu university journal of science and technology*, 1 (2), 171-180.
74. Sofowora, A., Ogunbodede, E., & Onayade, A. (2013). The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*, 10(5), 210–229.

75. Solorzano-Santos, F., & Miranda-Novales, M. (2012). Essential Oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2) 136-141.
76. Soto, E., Moreno, J., Estarrón, M., García, J., Obledo, E. (2006). Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* Against *Alternaria citri*. *e-Gnosis*, 4(16) 2–7.
77. Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., & Alipour, M. (2015). The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(3), 304-318.
78. Tang, S. S., Apisarnthanarak, A., & Hsu, L. Y. (2014). Mechanisms of  $\beta$ -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 78(1), 3–13.
79. Tiwari, V., Roy, R., & Tiwari, M. (2015). Antimicrobial active herbal compounds against *Acinetobacter baumannii* and other pathogens. *Frontiers microbiol*, 6(618), 1-11.
80. Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Giuseppe, B. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2474-2478.
81. Vázquez, B., Fente, C., Franco, C., Vázquez, M., & Cepeda, A. (2001). Efectos inhibidores de eugenol y timol en cepas de *Penicillium citrinum* en medios de cultivo y queso. *International Journal of food microbiology*, 2(3), 96-101.
82. Yin, Q., Yan, F., Zu, X., Wu, Y., Wu, X., Liao, M., Deng, S., Yin, L., & Zhuang, Y. (2012) Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol

on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*, 64 (1), 43–51.

83. Yu, H., Zhang, Z., Chen, J., Pei, A., Hua, F., Qian, X., He, J., Liu, C. F., & Xu, X. (2012). Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *PLoS one*, 7(3), 1-8.

84. Zeghad, N. (2013). Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus vulgaris* L. *Medicinal and aromatic plant research journal*, 1 (1), 5-11.

85. Zu, Y., Yu, H., Liang, L., Fu, Y., Efferth, T., Liu, X., & Wu, N. (2010). Activities of essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules*, 15 (5), 3200–3210.