



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE CINCO COMPUESTOS TERPENOIDES: CARVACROL, LIMONENO, LINALOOL, α -TERPINENO Y TIMOL[†]

[ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF FIVE TERPENOID COMPOUNDS: CARVACROL, LIMONENE, LINALOOL, α -TERPINENE AND THYMOL]

**Perla Ivonne Gallegos-Flores^{1,2}, Rómulo Bañuelos-Valenzuela^{1*},
Lucía Delgadillo-Ruiz², Carlos Meza-López¹ and Francisco Echavarría-Cháirez³**

¹Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Zacatecas. Carretera panamericana Zacatecas-Fresnillo, km 31.5 Calera de Victor Rosales, Zacatecas, C. P. 98500. Email: apozolero@hotmail.com

²Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas. Avenida preparatoria s/n colonia Hidráulica, Zacatecas, Zacatecas.

³Campo Experimental Zacatecas. INIFAP. Km 24.5, Carretera Zacatecas-Fresnillo, 98500, Calera, Zacatecas.

*Corresponding author

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad antibacteriana de cinco compuestos terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol en bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp y *Pseudomona* spp) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* spp). La actividad antibacteriana fue determinada por el método de difusión en disco agar Mueller-Hinton, como controles se utilizó alcohol al 70% y dos antibióticos (ceftibuteno y cefalexina) usados para bacterias Gram negativas y positivas respectivamente. Se prepararon cinco concentraciones de 0.75, 0.45, 0.15, 0.075 y 0.05 mg mL⁻¹ para los compuestos terpenoides y antibióticos. Los mayores halos de inhibición se presentaron con carvacrol (5.5 mm), linalool (6 mm) y timol (5.5 mm) en las bacterias *Salmonella* spp, *S. aureus* y *E. coli* respectivamente. Las bacterias más sensibles a los terpenoides fueron *E. coli*, *Salmonella* spp y *S. aureus* mientras que las bacterias más resistentes fueron *Pseudomona* spp y *Streptococcus* spp. Se concluye que no existe diferencia en la actividad antibacteriana entre los cinco compuestos terpenoides al ser expuestos con las bacterias Gram negativas y positivas, excepto cuando son evaluados con la bacteria *S. aureus* donde el carvacrol, limoneno y linalool tienen un efecto antibacteriano similar al antibiótico cefalexina.

Palabras clave: Actividad antibacteriana; antibióticos; bacterias Gram; compuestos terpenoides.

SUMMARY

The objective of the research was to evaluate the antibacterial activity of five terpenoid compounds: carvacrol, limonene, linalool, α -terpinene and thymol in Gram negative bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Pseudomona* spp) and Gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* spp). The antibacterial activity was determined by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar; as controls were used alcohol 70% and two antibiotics (ceftibuten and cephalixin) were used for Gram negative and positive bacteria respectively. Were made five concentrations of 0.75, 0.45, 0.15, 0.075 and 0.05 mg mL⁻¹ for the terpenoids compounds and antibiotics. The largest inhibition zone were presented with carvacrol (5.5 mm), linalool (6 mm) and thymol (5.5 mm) in the bacteria *Salmonella* spp, *S. aureus* and *E. coli* respectively. The bacteria most sensitive to the terpenoids were *E. coli*, *Salmonella* spp and *S. aureus* while the most resistant bacteria were *Pseudomona* spp and *Streptococcus* spp. It is concluded that there is no difference in antibacterial activity among the five terpenoids compounds when exposed to Gram negative and positive bacteria, except when evaluated with *S. aureus* bacteria where carvacrol, limonene and linalool have an antibacterial effect similar to that of cephalixin antibiotic.

Keywords: Antibacterial activity; antibiotics; Gram bacteria; terpenoid compounds.

INTRODUCCIÓN

El uso inadecuado de fármacos ha generado la aparición y propagación de bacterias multirresistentes para el humano y los animales (Estévez y Cutuli, 2011); por lo que las infecciones bacterianas han

generado un incremento en el índice de mortalidad, mayor costo en el tratamiento y atención médica (Schröppel y Riessen, 2013). Por ello que se ha hecho necesaria la búsqueda de alternativas que puedan ser eficaces en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias. La Organización Mundial de la Salud (OMS)

[†] Submitted February 14, 2019 – Accepted April 17, 2019. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License.
ISSN: 1870-0462

sugiere el uso de medicamentos naturales; si resultan ser seguros y efectivos para los consumidores (OMS, 2013).

Dichas alternativas sugieren como productos de origen natural a los vegetales por ser ricos en aceites esenciales y su contenido aromático de plantas como un tratamiento prometedor contra microorganismos patógenos (Weber *et al.*, 2014; Marasini *et al.*, 2015); ya que algunos vegetales poseen propiedades farmacológicas que han generado un creciente interés en el uso de sus metabolitos secundarios biológicamente activos como antimicrobianos, aislados y purificados a partir de estas plantas (Scur *et al.*, 2016). Entre los metabolitos secundarios aislados con actividad antibacteriana destacan los compuestos de la familia terpenoide.

Miles de compuestos que pertenecen a la familia de los terpenoides con propiedades antimicrobianas se han asociado a su composición química, estructura y grupos funcionales los cuales derivan de un precursor de cinco átomos de carbono, el difosfato de isopentenilo y con base al número de unidades de isopentenilo se clasifican como mono-, sesqui-, diterpenoides, entre otros, además la presencia y/o ausencia de algunos grupos funcionales específicos que diversifican aún más los compuestos que pertenecen a la misma subclase biosintética (Radulovic *et al.*, 2013); ejemplos de terpenoides de esta subclase son carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol.

Los terpenoides (carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol) pueden ser aislados a partir de plantas; los cuales tienen gran variedad de efectos biológicos, entre ellos antimicrobianos (antibacterianos, antifúngicos y antiparasíticos). A pesar de la baja toxicidad de los terpenoides y su simple disponibilidad de los recursos naturales, como son las plantas, el uso clínico todavía está limitado por su mayor concentración inhibitoria (IC₅₀) (Pokorny *et al.*, 2018); lo que ha instado a los científicos para buscar, evaluar y utilizar terpenoides con efecto antimicrobiano; como es el estudio de estos compuestos que presentan inhibición del crecimiento bacteriano contra un amplio espectro de bacterias Gram negativas y positivas (Scur *et al.*, 2016; Pokorny *et al.*, 2018).

La actividad antimicrobiana de los terpenoides puede explicarse por al menos cinco mecanismos de acción; estos incluyen, daño en la estructura y función de la membrana, inhibición de la biosíntesis y función de los ácidos nucleicos, interferencia de procesos metabólicos esenciales, inducción de la coagulación de los componentes citoplásmicos y la interrupción en la comunicación celular normal; estos mecanismos de acción pueden verse influenciados por varios factores, como las características de las células bacterianas

(bacterias Gram positivas y negativas), condiciones ambientales y fisicoquímicas (la hidrofobicidad, la concentración del compuesto, la temperatura y el pH) (Radulovic *et al.*, 2013).

El interés por encontrar compuestos con efecto antibacteriano es cada vez más frecuente debido a la resistencia y/o escasa actividad de algunos antibióticos frente a ciertas bacterias de interés clínico (Dou y Zhang, 2018), así como de uso veterinario (Estévez y Cutuli, 2011). Los terpenoides contienen propiedades antibacterianas, que pueden ocasionar muerte de las bacterias; por lo tanto, el objetivo fue evaluar el efecto antibacteriano en el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas en respuesta a la exposición de compuestos terpenoides como carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de compuestos terpenoides y controles (antibióticos, alcohol y agua)

Se desarrolló la metodología descrita por Burt *et al.* (2007) y Yuan *et al.* (2018) los cuales utilizaron concentraciones de 0.75, 0.45, 0.15, 0.075 y 0.05 mg mL⁻¹ de compuestos terpenoides. En esta investigación se trabajó con carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol reactivos químicamente puros de la marca Sigma Aldrich®, estos se prepararon en etanol absoluto (J.T. Baker): agua tridestilada (70:30 v/v). Como controles positivos se utilizaron los antibióticos ceftibuteno (específico para bacterias Gram negativas) y cefalexina (específico para bacterias Gram positivas) preparados a la misma concentración que los compuestos terpenoides. El control negativo fue agua tridestilada y etanol absoluto (J.T. Baker) (70:30 v/v).

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Los microorganismos utilizados fueron bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp y *Salmonella* spp y bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* spp. Las bacterias fueron proporcionadas por el laboratorio de microbiología de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, México; identificadas por pruebas bioquímicas en paneles comerciales con el equipo Phoenix 100 Becton Dickinson and Company® Sparks, Maryland 21152 USA por el laboratorio de bacteriología del hospital general en Fresnillo, Zacatecas, México. El stock de bacterias se mantuvo en conservación en medios nutritivos con glicerol a -20 °C, en un congelador horizontal para laboratorio hasta su uso. Antes de la prueba antibacteriana, los microorganismos se reactivaron en caldo nutritivo a 37 °C en una incubadora Thermo® durante 24 h (Delgadillo *et al.*, 2017).

Actividad antibacteriana

Para determinar la actividad antibacteriana se utilizó el método difusión en disco de papel (Delgadillo *et al.*, 2017), empleando diluciones bacterianas de 0.5 grados McFarland (la cual corresponde a una densidad celular aproximada de 1.5×10^8 UFC mL⁻¹), se tomaron 300 µL de la solución y se extendieron en cada una de sus respectivas placas Petri las cuales fueron preparadas con agar Mueller-Hinton (el medio agar Mueller-Hinton BD se preparó según las especificaciones del fabricante) sembradas a estría cerrada (para conseguir un crecimiento bacteriano uniforme) utilizando un asa estéril (Mith *et al.*, 2014). Las placas Petri inoculadas con cada una de las bacterias y los compuestos terpenoides fueron incubadas a 37 °C en una incubadora Thermo® durante 24 h. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. La actividad antibacteriana se evaluó midiendo el radio de las zonas de inhibición al milímetro más cercano del papel filtro (Martins *et al.*, 2014).

Análisis estadístico

El modelo experimental fue un diseño jerárquico u anidado, donde el nivel de dosis se encuentra anidado como componente de la varianza, en los tratamientos de los terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol. El análisis de varianza y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de medias Tukey, utilizando el paquete estadístico SAS 9 (SAS, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antibacteriana

El estudio fue realizado para evaluar la inhibición del crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas en respuesta a la exposición de diferentes terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol. En la Tabla 1, se describen los valores obtenidos de los halos de inhibición en milímetros (mm) en cada una de las cinco concentraciones empleadas para el análisis.

Los terpenoides son un grupo de compuestos antimicrobianos que son activos contra un amplio espectro de microorganismos, el mecanismo preciso de acción antibacteriana, aún no ha sido plenamente establecido, sin embargo, autores como Hernández-Hernández *et al.* (2014), Di pascua *et al.* (2006, 2007) han reportado que el efecto de estos compuestos se debe al carácter lipofílico, que ocasionan cambios o daños en la composición de ácidos grasos en la membrana exterior de bacterias e incrementan la permeabilidad causando pérdidas de ATP, fuga de iones y por lo tanto, lisis celular.

Como resultados de esta investigación (Tabla 1), se encontró que los mayores halos de inhibición para los cinco compuestos terpenoides se presentaron en carvacrol y timol a una concentración alta (0.75 mg mL⁻¹) y linalool a una concentración baja (0.05 mg mL⁻¹); condición similar a los estudios realizados por Dorman y Deans (2000), ellos investigaron el efecto de terpenoides contenidos en plantas aromáticas frente a veinticinco cepas bacterianas diferentes, incluidas *E. coli*, *Pseudomonas* spp, *Salmonella* spp y *S. aureus* y mostraron que todos los compuestos terpenoides evaluados; entre ellos carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol, tuvieron actividad antimicrobiana; pero los compuestos principales que exhibían el mayor efecto fueron carvacrol y timol.

Las diferencias en los resultados para los halos de inhibición bacteriana en milímetros presentada con cada terpenoide (Tabla 1), se atribuye a la estructura química de la molécula, presencia y/o ausencia de ciertos grupos funcionales y a la concentración; aunque la estructura química de los terpenoides evaluados es muy parecida entre ellas, la posición de un enlace en otro lugar o el cambio de un grupo funcional tiene un efecto diferente en la membrana de las bacterias analizadas, estas características fueron comprobadas en la investigación de Ultee *et al.* (2002), al analizar la actividad antimicrobiana de los compuestos timol, mentol, carvacrol metil éter y cimeno, compuestos que poseen estructuras similares a carvacrol y que solo difieren en una o dos formas. El timol tiene la misma fórmula química que el carvacrol, pero el grupo hidroxilo está en la posición meta en lugar de la posición orto, el mentol carece del anillo de benceno y en su lugar tiene un anillo de hexano cíclico, el carvacrol metil éter tiene el grupo hidroxilo reemplazado por un grupo de éter metílico y finalmente, el cimeno carece por completo de un grupo hidroxilo; con el trabajo de Ultee *et al.* (2002) observaron que el cimeno y el carvacrol metil éter carecían de actividad antibacteriana; por lo tanto la importancia del grupo hidroxilo en la estructura fenólica de ciertos compuestos químicos se confirmó por la mayor actividad antimicrobiana cuando el carvacrol se comparó con su respectivo éter metílico.

Las bacterias con mayor sensibilidad a los diferentes terpenoides analizados (Tabla 1) fueron las bacterias Gram negativas, *E. coli* y *Salmonella* spp y la bacteria Gram positiva *S. aureus*. Por lo tanto, las bacterias menos susceptibles fueron *Pseudomonas* spp y *Streptococcus* spp. Respecto a los cinco compuestos terpenoides evaluados y de acuerdo al modelo estadístico anidado, fueron diferentes estadísticamente respecto a los testigos utilizados ($p < 0.05$), aunque entre los cinco compuestos terpenoides fueron estadísticamente iguales ($p > 0.05$) al ser expuestos con las bacterias Gram negativas y positivas (Tabla 1), excepto cuando son evaluados con la bacteria *S. aureus*

donde el carvacrol, limoneno y linalool tienen un efecto antibacteriano ($p < 0.05$) similar al antibiótico cefalexina. Las bacterias con mayor susceptibilidad al carvacrol fueron *E. coli*, *Salmonella* spp (Gram negativas) y *S. aureus* (Gram positiva) (Tabla 1). La Storia *et al.* (2011) señalan que el efecto del carvacrol daña la membrana externa de las bacterias Gram negativas, y este efecto también se ha observado en *Salmonella* spp y *S. aureus*, donde se muestran evidencias que el sitio de acción del carvacrol es la membrana, por lo que en trabajos de Di-Pascua *et al.* (2006, 2007) se sugiere que el modo de acción de este compuesto es aumentando la fluidez y la

permeabilidad de la estructura bacteriana. Estudios realizados por Ait-Ouazzou *et al.* (2011) en *E. coli* con terpenoides (como carvacrol) han demostrado ocasionar una lesión subletal en las membranas externas y citoplásmicas ocasionando la ruptura de esta.

El limoneno pertenece a los hidrocarburos monoterpénicos cíclicos, estos son acumulados en la membrana plasmática microbiana y, por lo tanto, causan una pérdida de la integridad de esta (Sikkema *et al.*, 1994).

Tabla 1. Halos de inhibición de los diferentes estándares en milímetros (mm).

Principio activo	[mg mL ⁻¹]	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona</i> spp	<i>Salmonella</i> spp	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp
Agua	---	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^b
Alcohol	70%	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^b
Carvacrol	0.75	2.5 ± 0.7 ^b	2.0 ± 1.5 ^a	0 ± 0 ^b	5.0 ± 0 ^{bc}	0 ± 0 ^b
	0.45	2.5 ± 0.7 ^b	1.0 ± 0 ^a	1.0 ± 0 ^b	3.0 ± 2.8 ^{bc}	0 ± 0 ^b
	0.15	1.5 ± 0.7 ^b	0.5 ± 0 ^a	5.5 ± 3.5 ^b	0.7 ± 0 ^{bc}	0 ± 0 ^b
	0.075	3.0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^a	4.0 ± 1.4 ^b	2.0 ± 1.4 ^{bc}	2.5 ± 2.0 ^b
	0.05	2.5 ± 2.1 ^b	0 ± 0 ^a	0.5 ± 0 ^b	3.0 ± 2.8 ^{bc}	0 ± 0 ^b
Limoneno	0.75	0 ± 0 ^b	1.5 ± 0.7 ^a	1.5 ± 0.7 ^b	1.5 ± 0.7 ^{bc}	0 ± 0 ^b
	0.45	0.5 ± 0 ^b	1.0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b	4.0 ± 3.0 ^{bc}	0 ± 0 ^b
	0.15	2.0 ± 1.4 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b	3.0 ± 2.8 ^{bc}	0 ± 0 ^b
	0.075	2.0 ± 1.4 ^b	0 ± 0 ^a	3.0 ± 4.2 ^b	0.5 ± 0 ^{bc}	0 ± 0 ^b
	0.05	1.5 ± 0.7 ^b	0 ± 0 ^a	2.0 ± 0 ^b	4.0 ± 2.8 ^{bc}	0 ± 0 ^b
Linalool	0.75	1.5 ± 0.7 ^b	2.3 ± 0.3 ^a	1.5 ± 0.7 ^b	2.0 ± 1.4 ^{bc}	0 ± 0 ^b
	0.45	1.0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^a	1.5 ± 0.7 ^b	0 ± 0 ^{bc}	0 ± 0 ^b
	0.15	2.0 ± 0 ^b	1.0 ± 0 ^a	2.0 ± 1.4 ^b	0 ± 0 ^{bc}	0 ± 0 ^b
	0.075	1.0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^a	4.5 ± 6.3 ^b	2.5 ± 0.7 ^{bc}	0 ± 0 ^b
	0.05	1.5 ± 0.7 ^b	0 ± 0 ^a	2.0 ± 0 ^b	6.0 ± 1.4 ^{bc}	0 ± 0 ^b
Terpineno	0.75	1.5 ± 0.7 ^b	1.5 ± 0.7 ^a	4.5 ± 3.5 ^b	1.0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^b
	0.45	2.0 ± 0 ^b	1.0 ± 0 ^a	0.5 ± 0 ^b	1.0 ± 0.7 ^c	0 ± 0 ^b
	0.15	2.5 ± 0.7 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b	1.5 ± 0.7 ^c	0 ± 0 ^b
	0.075	1.0 ± 0 ^b	0.5 ± 0 ^a	2.5 ± 3.5 ^b	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^b
	0.05	1.0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^a	3.0 ± 4.2 ^b	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^b
Timol	0.75	5.5 ± 0.7 ^b	1.8 ± 0.3 ^a	4.5 ± 2.1 ^b	4.5 ± 0.7 ^c	2.0 ± 1.4 ^b
	0.45	2.5 ± 0.7 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b	2.0 ± 2.8 ^c	0 ± 0 ^b
	0.15	1.0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^a	0.5 ± 0 ^b	0 ± 0 ^c	0.5 ± 0 ^b
	0.075	2.5 ± 0.7 ^b	0 ± 0 ^a	0.5 ± 0 ^b	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^b
	0.05	1.5 ± 0.7 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^b
Ceftibuteno	0.75	10.2 ± 0.3 ^a	0 ± 0 ^a	14.0 ± 0 ^a	13.0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b
	0.45	10.5 ± 0.7 ^a	0 ± 0 ^a	14.5 ± 0.7 ^a	13.0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b
	0.15	10.0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	11.5 ± 0.7 ^a	12.0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b
	0.075	9.0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	10.0 ± 0 ^a	9.0 ± 1.4 ^a	0 ± 0 ^b
	0.05	7.5 ± 0.7 ^a	0 ± 0 ^a	10.5 ± 0.7 ^a	9.0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b
Cefalexina	0.75	5.5 ± 0.7 ^b	0 ± 0 ^a	7.0 ± 0 ^b	7.0 ± 0 ^b	5.0 ± 0 ^a
	0.45	5.0 ± 1.4 ^b	0 ± 0 ^a	6.0 ± 0 ^b	5.5 ± 0.7 ^b	4.0 ± 0 ^a
	0.15	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^a	1.5 ± 2.1 ^b	5.0 ± 1.4 ^b	4.5 ± 0.7 ^a
	0.075	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b	4.5 ± 0.7 ^b	2.5 ± 1.4 ^a
	0.05	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b	4.0 ± 1.4 ^b	0 ± 0 ^a

* Valores de medias con letras distintas en la misma columna son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

En la Tabla 1, se puede observar que la bacteria con mayor susceptibilidad a este compuesto fue *S. aureus* y para el resto de las bacterias los halos de inhibición fueron muy pequeños o nulos, por lo que se ha considerado evaluar el efecto del limoneno en conjunto con algún tratamiento fisicoquímico para aumentar la efectividad de este compuesto, ya que se ha documentado que la actividad antibacteriana de este terpenoide aumenta al someterse a tratamientos con pH ácidos y variaciones de temperatura; lo cual genera un efecto de sinergia con el compuesto limoneno, por lo que, las bacterias se ven afectadas de manera gradual, tal como lo reportan Espina *et al.* (2013) donde al evaluar el efecto de (+) limoneno contra la cepa de *E. coli* (BJ4), el grado de inactivación de *E. coli* logrado por limoneno se vio afectado por el medio de tratamiento, siendo más bactericida a pH 4.

Herman *et al.* (2015) mencionan que linalool tiene mejor efecto antibacteriano contra *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* que los aceites puros de *L. angustifolia* y *C. paradise*. En este trabajo se observa el efecto del linalool contra *Salmonella* spp y *S. aureus* (Tabla 1), los halos de mayor inhibición corresponden a 4.5 y 6 mm en concentraciones bajas de 0.075 y 0.05 mg mL⁻¹ respectivamente. Herman *et al.* (2016) al emplear la misma metodología que se utilizó en el presente estudio (método de difusión en disco) e impregnar los discos de papel filtro con 10 µL del compuesto linalool marca Sigma Aldrich, obtuvieron halos de inhibición de 21, 13 y 8 mm para *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente.

Los terpenos no representan un grupo de constituyentes con alta actividad antimicrobiana, por ejemplo, el p-cimeno, uno de los componentes principales en el tomillo, no mostro actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas del género *Shigella* incluso a concentraciones elevadas (10% v/v) como lo reporta Bagamboula *et al.* (2004). En la investigación de Dorman y Deans (2000) el α -pineno, el β -pineno, el (+) sabineno y el α -terpineno mostraron actividad antimicrobiana baja o nula frente a 25 géneros diferentes de bacterias que afectan a los animales, plantas y productos alimenticios, entre ellas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella pullorum* y *S. aureus*.

Koutsoudaki *et al.* (2005) al comparar la actividad antibacteriana de α -pineno, β -pineno, p-cimeno, β -mirreno, β -cariofileno, y γ -terpineno contra *E. coli*, *S. aureus* y *Bacillus cereus* encontraron un efecto nulo o bajo sobre dichas bacterias. P-cymene y γ -terpineno fueron ineficaces como fungicidas contra *Saccharomyces cerevisiae* (Rao *et al.*, 2010). Estos ensayos *in vitro* indican que los terpenos son ineficaces como antimicrobianos cuando se aplican como compuestos individuales. En Tabla 1, se puede observar que el mayor halo de inhibición se presentó

en *Salmonella* spp mientras que en el resto de las bacterias los halos de inhibición fueron bajos o nulos, lo cual corresponde a lo indicado por previos investigadores, donde hacen referencia que el α -terpineno no tiene efecto antimicrobiano, esto sugiere que la ausencia del grupo funcional hidroxilo es importante para aumentar el efecto antibacteriano (Ultee *et al.*, 2002).

El timol ha demostrado tener un amplio espectro de actividad contra gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Du *et al.*, 2015), este terpenoide es estructuralmente similar al carvacrol, teniendo el grupo hidroxilo en una posición diferente en el anillo fenólico. El mecanismo de acción antibacteriano sugiere que implica la disrupción de membrana externa e interna y la interacción con proteínas de membrana y dianas intracelulares de las bacterias, afectando la permeabilidad de la membrana (Di Pasqua *et al.*, 2010). En la Tabla 1, se observa que el mayor efecto se presentó en la bacteria *E. coli* seguido de *Salmonella* spp y *S. aureus* a una concentración elevada de timol (0.75 mg mL⁻¹). Shapira y Mimran (2007) al evaluar el efecto de exposición de *E. coli* con timol, infieren que este compuesto provocó la liberación de fosfolípidos y la disrupción de la membrana externa.

Las concentraciones de los terpenoides donde se registraron los halos de mayor inhibición fueron a las concentraciones de 0.75 mg mL⁻¹ para carvacrol y timol y una concentración de 0.05 mg mL⁻¹ para linalool, con respecto a los antibióticos, estos presentaron halos de inhibición en cada una de las concentraciones evaluadas obteniéndose halos de inhibición para el ceftibuteno de 7.5 a 15 mm y para la cefalexina se presentaron halos de 1.5 a 7 mm (Tabla 1).

Como se observa en la Tabla 1 la concentración mínima inhibitoria para *S. aureus* fue con el compuesto linalool a la concentración de 0.75 mg mL⁻¹, carvacrol 0.15 mg mL⁻¹ y timol 0.45 mg mL⁻¹. Mujeeb *et al.* (2014) observaron que la concentración mínima inhibitoria de terpenoides para *S. aureus* fue de 40 mg mL⁻¹ contenidos en extractos etanólicos de hojas de *Aegle marmelos*, observando halos de inhibición de 10.3 mm. En esta investigación se observó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) para *E. coli* con carvacrol fue 0.15 mg mL⁻¹, linalool 0.075 mg mL⁻¹ y timol 0.15 mg mL⁻¹ presentando halos de 1, 1.5 y 1 mm respectivamente. Mith *et al.* (2014) observaron que la CMI para *E. coli* en carvacrol fue 1.25 µg mL⁻¹, para linalool fue 1 µg mL⁻¹ y para timol fue de 0.25 µg mL⁻¹, observando halos de inhibición de 22, 12 y 23 mm respectivamente, para la bacteria del genero *Salmonella* la CMI oscilo entre 0.25 y 1.25 µg mL⁻¹ con halos de inhibición de 10 a 23 mm y para la

bacteria del género *Pseudomona* la CMI fue de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ con halos de inhibición de 8 a 19 mm.

Los resultados de esta investigación presentan diferencias en el tamaño de los halos de inhibición en la actividad antibacteriana de los compuestos terpenoides seleccionados contra las bacterias como lo reportan Mujeeb *et al.* (2014) y Mith *et al.* (2014) 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.

Los antibióticos evaluados fueron seleccionados a partir de su mecanismo de acción similar al de los terpenoides; en el cual su sitio diana es la membrana bacteriana; por lo que el mecanismo de acción del ceftibuten y cefalexina es inhibir la síntesis de esta estructura bacteriana. En la Tabla 1, como era de esperarse los mayores halos de inhibición fueron; ceftibuten para bacterias Gram negativas y cefalexina para Gram positivas.

Los antibióticos actúan inhibiendo diversos procesos metabólicos que son esenciales para la supervivencia de los microorganismos. Varias clases de antibióticos actúan inhibiendo la síntesis del peptidoglucano (inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana), ya sea por bloqueo directo del lugar catalítico de alguna enzima, o mediante la formación de complejos con determinados sustratos. Con la excepción de *Chlamydiae* (géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila*), *Mycoplasma*, *Ehrlichia* y *Anaplasma*, las bacterias poseen una pared externa constituida por al menos dos capas de una estructura glucoproteica denominada peptidoglucano, que les da forma y confiere resistencia osmótica, en la síntesis de este compuesto participan al menos treinta enzimas, que ejercen su función en compartimientos celulares distintos. Las cefalosporinas son antibióticos bactericidas y su mecanismo de acción es interferir con la síntesis del componente péptidoglucano de la pared celular bacteriana, a través de la unión a la proteína fijadora de penicilina e inactivación de los inhibidores de la autolisina endógena; esta rompe las paredes celulares bacterianas y produce la muerte del microorganismo por lisis. Las cefalosporinas, incluyendo las de tercera generación, al fijarse a sus proteínas blanco en la membrana de la célula bacteriana, inactivan las enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular (Madigan *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

Los terpenoides con mayor efecto sobre las bacterias analizadas fueron el carvacrol y timol, seguidos por el linalool y limoneno y por último el terpineno. Las bacterias con mayor sensibilidad a estos compuestos

fueron *E. coli*, *Salmonella* spp y *S. aureus*. La bacteria más resistente a los principios activos evaluados fue *Streptococcus* spp. No existe diferencia significativa en la actividad antibacteriana entre los cinco compuestos terpenoides evaluados al ser expuestos con las bacterias Gram negativas y positivas, excepto cuando son evaluados con la bacteria *S. aureus* donde el carvacrol, limoneno y linalool tienen un efecto antibacterial similar al antibiótico cefalexina. Estos resultados sugieren el uso de estos compuestos como línea base para la síntesis de moléculas útiles a nivel farmacéutico.

REFERENCIAS

- Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C. 2011. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innov Food Sci Emerg* 12: 320–329.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M., Debevere, J. 2004: Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cimene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21: 33–42. doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7
- Burt, S., Zee, R., Koets, A., de Graaff, A., van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H., Veldhuizen, E. 2007. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (14): 4484-4490. doi: 10.1128/AEM.00340-07
- Delgadillo, R.L., Bañuelos, V.R., Delgadillo, R.O., Silva, V.M., Gallegos, F.P. 2017. Chemical composition and antibacterial effect *in vitro* of extracts of *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* and *Ruta graveolens*. *Nova Scientia*. 9(19), 273-290. doi: 10.21640/ns.v9i19.1019
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G. and Mauriello, G. 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54. 2745–2749. doi: 10.1021/jf0527221
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D. and Mauriello, G. 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55. 4863–4870. doi: 10.1021/jf0636465

- Di Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D., Mauriello, G. 2010. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics*. doi: 10.1040-1049. doi.org/10.1002/pmic.200900568
- Dorman, H., Deans, S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 308-316. doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x
- Dou, Y., Zhang, Q. 2018. Analysis of distribution and drug resistance of pathogens of burn patients during 9 years. *Chinese Journal of Burns*. 20; 34(3): 153-159. doi: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2018.03.008.
- Du, E., Gan, L., Li, Z., Wang, W., Liu, D., Guo, Y. 2015. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 6: 58. doi.org/10.1186/s40104-015-0055-7
- Espina, L., Gelaw, T.K., de Lamo-Castellví, S., Pagán, R., García-Gonzalo, D. 2013. Mechanism of bacterial inactivation by (+)-limonene and its potential use in food preservation combined processes. *PLoS one*, 8(2): e56769. doi.org/10.1371/journal.pone.0056769
- Estévez, R., Cutuli, T. 2011. Alternativas en promoción del crecimiento tras la prohibición de los antibióticos I: Modificadores metabólicos y modificadores inmunológicos. *Información Veterinaria*, 4, 18-23. ISSN1130-5436
- Herman, A., Tambor, K., Herman, A. 2015. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils. *Curr Microbiol*. 72:165. doi.org/10.1007/s00284-015-0933-4
- Herman, A., Tambor, K., Herman, A. 2016. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils. *Current Microbiology*. 72(2):165-72. doi: 10.1007/s00284-015-0933-4.
- Hernández-Hernández, E., Regalado-González, C., Vázquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I., García-Almendárez, B.E. 2014. Microencapsulation, chemical characterization and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens* H.B.K.) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. *The Scientific World Journal*, 2014. doi.org/10.1155/2014/641814
- Koutsoudaki, C., Krsek, M., Rodger, A. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* var. chia. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53. 7681-5. doi.org/10.1021/jf050639s.
- La Storia, A., Ercolini, D., Marinello, F., Di Pasqua, R., Villani, F., Mauriello, G. 2011. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol- treated bacterial cells. *Research in Microbiology*, 162 (2), 164-172. doi.org/10.1016/j.resmic.2010.11.006
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., Clark, D. 2009. Estructura y función en bacterias y arqueas. Ed. Pearson Educación, 12, 73-115.
- Marasini, B.P., Baral, P., Aryal, P., Ghimire, K.R., Neupane, S., Dahal, N., Singh, A., Ghimire, L., Shrestha, K. 2015. Evaluation of antibacterial activity of some traditionally used medicinal plants against human pathogenic bacteria. *BioMed Research International*, 2015. doi.org/10.1155/2015/265425
- Martins, N., Barros, L., Santos, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I. 2014. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 158: 73-80. doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.099
- Mith, H., Duré, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., Clinquart, A. 2014. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition*, 2(4): 403-416. doi.org/10.1002/fsn3.116
- Mujeeb, F., Bajpai, P., Pathak, N. 2014. Phytochemical evaluation, antimicrobial activity and determination of bioactive components from leaves of *Aegle marmelos*. *BioMed Research International*, 2014. doi:10.1155/2014/497606.
- OMS (Organización Mundial de Salud). 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/iris/handle/10665/95008> consultada el 23 de febrero 2019.
- Pokorny, J., Borkova, L., Urban, M. 2018. Click reactions in chemistry of triterpenes-advances towards development of potential therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*. 25: 636. doi.org/10.2174/0929867324666171009122612

- Radulovic, N.S., Blagojevic, P.D., Stojanovic-Radic, Z.Z., Stojanovic, N.M. 2013. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Current Medicinal Chemistry*, 20(7): 932–952. doi:10.2174/0929867311320070008
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., Rao, R. 2010. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR Pathway. *Antimicrob Agents Chemother* 54(12): 5062-9
- SAS Institute Inc. 2011. SAS 9.3. Cary, NC:SAS Institute Inc.
- Schröppel, K., Riessen, R. 2013. Multiresistant Gram-negative bacteria. A bacterial challenge of the twenty-first century. *Medizinische Klinik-Intensivmedizin und Notfallmedizin*. 108(2): 107-12. doi: 10.1007/s00063-012-0160-8.
- Scur, M.C., Pinto, F.G., Pandini, J.A., Costa, W. F., Leite, C.W., Temponi, L.G. 2016. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. *Brazilian Journal of Biology*. 76(1): 101-108. dx.doi.org/10.1590/1519-6984.13714.
- Shapira, R. and Mimran, E. 2007. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants exhibiting altered response to thymol. *Microbial Drug Resistance*. 13(3): 157-165. doi.org/10.1089/mdr.2007.731
- Sikkema, J., de Bont, J., Poolman, B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269: 8022–8028. <http://www.jbc.org/content/269/11/8022.full.pdf>
- Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(4): 1561–1568. doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002
- Weber, L.D., Pinto, F.G.S., Scur, M.C., Souza, J.G.L., Costa, W.F., Leite, C.W. 2014. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia*. *African Journal of Agricultural Research*, (9), 846-853. doi: 10.5897/AJAR2013.8260.
- Yuan, W., Seng, Z.J., Kohli, G.S., Yang, L., Yuk, H.G. 2018. Stress resistance development and genome-wide transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 adapted to sublethal thymol, carvacrol and trans-cinnamaldehyde. *Applied and Environmental Microbiology*. 84 (22): e01616-18. doi:10.1128/aem.01616-18