



INHIBICIÓN DE MOVILIDAD BACTERIANA A PARTIR DE COMPUESTOS TERPENOIDES Y ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS † [INHIBITION OF BACTERIAL MOBILITY BY TERPENOID COMPOUNDS AND PLANT ESSENTIAL OILS]

Perla Iyonne Gallegos-Flores¹, Lucía Delgadillo-Ruiz¹,
Rómulo Bañuelos-Valenzuela², Francisco Echavarría-Cháirez³,
Benjamín Valladares-Carranza⁴ and Carlos Meza-López^{2*}

¹Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas.
Avenida preparatoria s/n colonia Hidráulica, Zacatecas, Zacatecas, México.

²Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Zacatecas. Carretera panamericana Zacatecas-Fresnillo, km 31.5 Calera de Víctor Rosales, Zacatecas, México, C. P. 98500. Email.: carmezlop@yahoo.com.mx

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

⁴Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Km. 15.5 Carretera Toluca-Atacomulco, Toluca, Estado de México. México, C.P. 50295

*Corresponding author

SUMMARY

Background: The essential oils of plants and active principles (terpenoids) have antimicrobial effect, since they interact directly with the bacterial membrane causing the leakage of ions and other cytoplasmic compounds, as well as inhibiting the development of mobility and adhesion structures (flagella and fimbriae) in bacteria. **Objective:** To determine the inhibition of mobility in bacteria from terpenoid compounds and essential oils of plants. **Methodology:** The essential oil was extracted by hydrodistillation of the plants *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum*, *Eucalyptus* spp, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare* and *Salvia rosmarinus*. The terpenoids: carvacrol, limonene, linalol, terpinene and thymol were identified by gas chromatography. Inhibition of mobility was evaluated in SIM medium. Statistical analysis was performed using descriptive statistics and main components (PC), from these data they were graphically contrasted to group the treatments that were able to inhibit mobility. **Results:** The bacteria in order of sensitivity affected by each of the terpenoids and essential oils of plants were *Clostridium* spp, with 76.2%; *E. coli* (71.45%) and *Salmonella* spp (57.1%), so the *Pseudomona* spp bacteria was the most resistant, presenting a total inhibition percentage of 47.6%. Carvacrol acted as an inhibitor at a concentration of 0.75 mg mL⁻¹ in *Clostridium* spp and *E. coli*. Limonene, linalol and thymol, affected mobility in concentrations 0.05, 0.15, 0.75 mg mL⁻¹, on *Clostridium* spp, *E. coli* and *Salmonella* spp. The CP analysis showed the highest correlation of 0.9956 for *Pseudomona* spp. **Implications:** The terpenoid compounds and essential oils of plants are an alternative for the synthesis of antibacterial active principles. **Conclusions:** The inhibition of mobility in *Clostridium* spp, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Pseudomona* spp was presented at a concentration of 0.75 mg mL⁻¹ for the terpenoid compounds limonene, linalol and thymol, as well as in the essential oils of peppermint and oregano.

Key words: Fimbriae; bacterial flagella; inhibition; mobility; terpenoids.

RESUMEN

Antecedentes: Los aceites esenciales de plantas y principios activos (terpenoides) tienen efecto antimicrobiano, ya que interactúan directamente con la membrana bacteriana provocando la fuga de iones y otros compuestos citoplasmáticos, así como inhibir el desarrollo de estructuras de movilidad y adhesión en bacterias (flagelos y fimbrias). **Objetivo:** Determinar la inhibición de movilidad en bacterias a partir de compuestos terpenoides y aceites esenciales de plantas. **Metodología:** Se extrajo el aceite esencial por hidrodestilación de las plantas *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum*, *Eucalyptus* spp, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare* y *Salvia rosmarinus*. Se identificaron los terpenoides: carvacrol, limoneno, linalol, terpineno y timol por cromatografía de gases. La inhibición de movilidad fue evaluada en medio SIM. El análisis estadístico se realizó mediante estadística descriptiva y componentes principales (CP), a partir de estos datos se contrastaron gráficamente para agrupar los tratamientos que fueron capaces de inhibir

† Submitted August 12, 2021 – Accepted December 2, 2021. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License.
ISSN: 1870-0462.

la movilidad. **Resultados:** Las bacterias en orden de sensibilidad afectadas por cada uno de los terpenoides y aceites esenciales de plantas fueron *Clostridium* spp, con un 76.2%; *E. coli* (71.45%) y *Salmonella* spp (57.1%), por lo que la bacteria *Pseudomona* spp fue la más resistente al presentar un porcentaje total de inhibición del 47.6%. El carvacrol actuó como inhibidor a concentración 0.75 mg mL⁻¹ en *Clostridium* spp y *E. coli*. El limoneno, linalol y timol, afectaron la movilidad en concentraciones 0.05, 0.15, 0.75 mg mL⁻¹, sobre *Clostridium* spp, *E. coli* y *Salmonella* spp. El análisis de CP mostro la mayor correlación de 0.9956 para *Pseudomona* spp. **Implicaciones:** Los compuestos terpenoides y aceites esenciales de plantas son una alternativa para la síntesis de principios activos antibacterianos. **Conclusiones:** La inhibición de movilidad bacteriana en *Clostridium* spp, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp y *Pseudomona* spp se presentó en una concentración de 0.75 mg mL⁻¹ para los compuestos terpenoides limoneno, linalol y timol, así como en los aceites esenciales de menta y orégano.

Palabras clave: Fimbrias; flagelos bacterianos; inhibición; movilidad; terpenoides.

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas para la extracción de aceites esenciales ha sido de gran interés por sus propiedades organolépticas, químicas y medicinales, esto se debe a la gran cantidad de compuestos bioactivos presentes como son los terpenoides; los cuales tienen grandes beneficios nutracéuticos y son ampliamente utilizados como tratamiento para diversas enfermedades con fines antivirales y antimicrobianos (Sharma *et al.*, 2017, Lim and Choi, 2019, Rodríguez *et al.*, 2019). El interés del uso de aceites esenciales surge por la resistencia y escasa actividad de algunos antibióticos frente a microorganismos patógenos; lo que ha generado la necesidad de incrementar la búsqueda y experimentación científica de plantas medicinales con propiedades antimicrobianas (Liu *et al.*, 2017, Nair *et al.*, 2017, Breijyeh *et al.*, 2020). Muchos de los antibióticos utilizados para tratar infecciones bacterianas han sido purificados a partir de plantas, ya que sus principios activos proporcionan nuevas fuentes terapéuticas contra las bacterias resistentes a los antibióticos (Sharma *et al.*, 2017, Kokoska *et al.*, 2019, Sathoff and Samac, 2019, Soliman *et al.*, 2021), en la actualidad se han realizado múltiples trabajos encaminados para evaluar el efecto antimicrobiano de los compuestos químicos aislados a partir de las plantas y han dado las bases científicas como alternativa de tratamiento en procesos infecciosos, es por ello que en los últimos años se ha recurrido al uso de extractos y aceites esenciales como antimicrobianos (Oliveira *et al.*, 2007, Niño *et al.*, 2012, Debalke *et al.*, 2018, Soliman *et al.*, 2021).

Las bacterias han mostrado gran diversidad de mecanismos para realizar funciones biológicas específicas relacionadas con el entorno particular en el que se desarrollan, así como de resistencia y/o patogenicidad para sobrevivir; entre ellas se encuentra la secreción de proteínas extra-citoplasmáticas, que ayudan a la adhesión e invasión del tejido en el huésped, la transferencia de información genética por conjugación, el ensamblaje de bacteriófagos y la movilidad celular bacteriana (Fernández and Berenguer, 2000, El Ghmari *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2009). En las bacterias la síntesis y desarrollo de estructuras tubulares superficiales de gran tamaño

(flagelos y fimbrias) ayudan en el proceso de adhesión e invasión del tejido en el huésped y la movilidad celular bacteriana en respuesta a estímulos ambientales, físicoquímicos y quimio- sensoriales, favoreciendo así la patogenicidad de las bacterias (Van Gerven *et al.*, 2011, Barken *et al.*, 2008, Yamamoto *et al.*, 2012, Sangermani *et al.*, 2019).

Los flagelos bacterianos son estructuras proteicas complejas, los cuales están anclados a la membrana bacteriana y tienen la función de dar movilidad con efecto de hélice mediante la rotación. La estructura del flagelo está constituida por tres partes: un filamento largo y helicoidal, un gancho de torsión y un cuerpo basal complejo. El filamento está formado por la subunidad proteica llamada flagelina (50-60 kDa), tiene un diámetro constante de alrededor de 20 nm y una longitud variable que depende del número de subunidades de flagelina ensambladas (5-10 µm). El gancho es una estructura cilíndrica corta similar al filamento con una longitud aproximadamente de 50-60 nm, cuya función es el acoplamiento flexible al filamento. El cuerpo basal es una estructura compleja que atraviesa la envoltura celular y se extiende hacia el interior del citoplasma. En bacterias Gram negativas, el cuerpo basal, de manera general consta de una barra central y tres anillos de proteínas llamados L (para lipopolisacárido), P (para peptidoglicano) y MS (membrana/supramembrana). Los anillos L y P están incrustados dentro de la membrana externa y las capas de peptidoglicanos, mientras que el anillo MS está insertado en la porción de la membrana interna (Homma *et al.*, 1990, Fernández and Berenguer, 2000, Van Gerven *et al.*, 2011, Jarrell *et al.*, 2013).

Las fimbrias, también conocidas como pili, son apéndices helicoidales sencillos y similares a pelos formados por subunidades proteicas llamadas fimbrinas o pilinas y generalmente se extienden de 1 a 2 µm desde la superficie bacteriana con diámetros que oscilan entre 2 y 8 nm. Las fimbrias, están asociadas con propiedades de adhesión al tejido del huésped de importantes cepas bacterianas patógenas; como los pili clase I de cepas uropatógenas de *E. coli* y *Salmonella* y los pili tipo IV de *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella* spp., *Neisseria* spp., *Vibrio cholerae* y cepas enteropatógenas y enterotoxigénicas de *E. coli*

(Hanson and Brinton 1988, Fernández and Berenguer, 2000, Van Gerven *et al.*, 2011).

Como ya se mencionó, los aceites esenciales de plantas contienen propiedades antimicrobianas; entre ellas inhibir el desarrollo de estructuras de movilidad y la adhesión de bacterias en el tejido huésped, el mecanismo de acción de los aceites de plantas está estrechamente relacionado con los metabolitos secundarios (terpenoides) que poseen, debido a que estos compuestos son capaces interactuar directamente con la membrana bacteriana y el citoplasma del patógeno o bien, gracias a su hidrofobicidad pueden incorporarse a los fosfolípidos de la membrana celular bacteriana en donde se da lugar a una fuga de iones, organelos y otros compuestos bacterianos provocando lisis celular (Sikkema *et al.*, 1994, Di Pascua *et al.*, 2006, 2007, La Storia *et al.*, 2011, Radulovic *et al.*, 2013). Por lo tanto, el objetivo del trabajo fue evaluar la inhibición de movilidad en bacterias a partir de compuestos terpenoides y aceites esenciales de plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal utilizado fue proporcionado por Delgadillo-Ruiz *et al.* (2021) para la extracción de aceite esencial fue canela (*Cinnamomum zeylanicum*), clavo (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus* spp), menta (*Mentha spicata*), orégano (*Origanum vulgare*) y romero (*Salvia rosmarinus*).

Extracción del aceite esencial

Se realizó por hidrodestilación durante 2 h, utilizando un sistema Clevenger modificado a partir de la muestra seca y triturada. El fundamento de la metodología radica que, durante el proceso de ebullición, el material seco absorbe agua y el aceite esencial difunde a través de las paredes celulares por medio de ósmosis, luego es vaporizado y arrastrado por la corriente del evaporador (Teixeira *et al.*, 2013).

Composición química de cada uno de los aceites esenciales determinada por cromatografía de gases

El equipo empleado fue un cromatógrafo de gases (CG; Agilent Technologies serie 6890N), empleando la columna polar DB_WAXetr. Las condiciones de la marcha analítica fueron; temperatura después de la inyección 250 °C a una presión de 12.13 psi con un flujo de He 36.5 mL min⁻¹. Las condiciones para la columna fueron; temperatura inicial 50 °C de cero a dos minutos, con un aumento de 10 °C hasta llegar a 250 °C, utilizando un detector de flama ionizante (FID) a una temperatura de 210 °C con un flujo de H₂ de 40 mL min⁻¹ y un flujo de aire de 450 mL min⁻¹; previamente se realizó una curva de calibración. Los

estándares utilizados fueron grado reactivo marca Sigma Aldrich®: carvacrol, limoneno, linalol, terpineno, y timol. Cada una de las determinaciones se realizó por triplicado (Bañuelos *et al.*, 2018).

Preparación de compuestos terpenoides para la prueba de movilidad

Los estándares fueron carvacrol, limoneno, linalol, 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) a una concentración de 0.05, 0.15 y 0.75 mg mL⁻¹ de acuerdo con la metodología descrita por Burt *et al.* (2007) y Delgadillo-Ruiz *et al.* (2021).

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Los microorganismos utilizados fueron *Clostridium* spp, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp y *Pseudomona* 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. Previamente antes de iniciar con la prueba de movilidad los microorganismos se reactivaron en caldo nutritivo a 37 °C en una incubadora Thermo® durante 24 h (Gallegos *et al.*, 2019).

Preparación del medio SIM en tubo con cada uno de los aceites esenciales y terpenoides

Se preparó medio SIM para cada tipo de estándar y extracto. El medio SIM fue preparado de acuerdo con las especificaciones del fabricante; se pesaron 30 g de agar por cada litro de agua destilada; el agar fue esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 min. Se dejó enfriar el agar a una temperatura de 35 °C aproximadamente, antes de adicionar el aceite esencial y el terpenoide correspondiente (0.5 mL del compuesto por cada 4 mL de medio SIM) en tubos estériles de 10 mL. Se utilizó un testigo el cual contiene únicamente medio SIM. Para cada bacteria se realizó una serie de tubos por triplicado con los aceites esenciales de plantas y terpenoides antes mencionados (Silva-Vega *et al.*, 2020).

Pruebas de movilidad bacteriana

La siembra en tubo de cada una de las bacterias se realizó mediante picadura; que consiste en tomar una colonia aislada de bacterias y hacer una picadura en el medio SIM, atravesando el agar hasta el fondo del tubo.

Una vez terminada la siembra, todas las muestras permanecieron a una temperatura de 37 °C, en una incubadora Thermo® durante un periodo de 24 h. La siembra se hizo con debida esterilidad para evitar contaminación en una campana de flujo laminar (Lab tech®). La movilidad bacteriana fue medida, usando un método cualitativo; a) motilidad positiva (+/1): presencia de turbidez en el medio. b) motilidad negativa (-/0): ausencia o presencia leve de crecimiento, solo en el sitio de la picadura (Silva-Vega *et al.*, 2020).

Análisis estadístico

La información obtenida se analizó mediante una estadística descriptiva y de un análisis de componentes principales (CP), para lo cual se utilizó el programa SAS (SAS, 2011). A partir de los datos de los CP construidos, se contrastaron gráficamente para agrupar los tratamientos que fueron capaces de inhibir la movilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aceites esenciales (AE) son sustancias volátiles que se obtienen de diferentes partes de la planta como flores, tallos, hojas, semillas, raíces, frutos y corteza; y su efecto biológico depende de la composición química y concentración de principios activos, el tipo de planta y especie, lugar de origen y el método de preparación de estos (Vokou *et al.*, 1993). Los AE son ampliamente conocidos por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, insecticidas y antivirales, por lo que estos efectos biológicos, están relacionados principalmente con los principios activos terpenos y fenilpropanoides (Bakkali *et al.*, 2008, Raut and Karuppayil, 2014, Swamy *et al.*, 2016).

En el análisis de los principios activos para los AE por cromatografía de gases (Tabla 1), reportado por Delgadillo-Ruiz *et al.* (2021), se puede comprobar que de acuerdo al tipo de planta se obtuvieron diferentes concentraciones de cada uno de los estándares analizados, mostrando que la mayor concentración de carvacrol y timol está presente en los aceites de clavo (carvacrol 303 mg mL⁻¹) y orégano (carvacrol 1.652

mg mL⁻¹; timol 0.247 mg mL⁻¹), por otra parte el aceite esencial de menta contiene la mayor concentración de terpineno (4.8388 mg mL⁻¹), el cual es el precursor de carvacrol y timol.

El uso de AE es cada vez más aceptado debido a la necesidad de emplear compuestos naturales eficaces que no provoquen efectos nocivos para la salud y el ambiente; los terpenoides (carvacrol y timol), presentan un efecto antibacteriano contra bacterias de interés clínico (Gram negativas y positivas), cuyo principal mecanismo de acción es incrustarse en la membrana de la célula bacteriana, provocando la desintegración de esta estructura, seguido de lisis celular (García-García *et al.*, 2011, Friedman, 2014, Rodríguez-García *et al.*, 2015).

En la Tabla 2, se describe el orden de los tratamientos evaluados, donde los controles corresponden a T1 y T2, los terpenoides (carvacrol, limoneno, linalol, terpineno y timol) están representados por los tratamientos del T3 al T17, los cuales presentan tres concentraciones en mg mL⁻¹ (0.05, 0.15 y 0.75) (Burt *et al.*, 2007), los aceites esenciales de plantas (100% puros) identificados como T18 al T23. Las bacterias evaluadas fueron Gram positiva (*Clostridium spp*) y Gram negativas (*E. coli*, *Pseudomona spp* y *Salmonella spp*). La movilidad es representada por uno y la inhibición está representada por cero.

Las bacterias en orden de sensibilidad afectadas por cada uno de los tratamientos fueron *Clostridium spp*, con un 76.2%; *E. coli* (71.45%) y *Salmonella spp* (57.1%), por lo que la bacteria *Pseudomona spp* fue la más resistente al presentar un porcentaje total de inhibición del 47.6%.

Con respecto a los tratamientos para cada terpenoide, las cuatro bacterias evaluadas no presentaron inhibición de movilidad con el estándar de carvacrol en concentraciones 0.05 y 0.15 mg mL⁻¹, sin embargo, a 0.75 mg mL⁻¹ *Clostridium spp* y *E. coli* su crecimiento y movilidad en medio SIM fue inhibido; este resultado concuerda con lo reportado por Burt *et al.* (2007), donde señalaron que las bacterias *E. coli* crecen en

Tabla 1. Concentración de terpenoides presentes en los aceites esenciales determinados por cromatografía de gases.

| Aceite esencial | Carvacrol (mg mL ⁻¹) | Limoneno (mg mL ⁻¹) | Linalol (mg mL ⁻¹) | Terpineno (mg mL ⁻¹) | Timol (mg mL ⁻¹) |
|-----------------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Canela | 0.0375 | 2.5167 | 0.047 | 0.1431 | 0.0108 |
| Clavo | 303 | 1.5496 | 0.0383 | 0.2753 | 0.0068 |
| Eucalipto | 0.07 | 499 | 0.4621 | 0.8725 | 0.0142 |
| Menta | 0.0169 | 9.56 | 3.9401 | 4.8388 | 0.025 |
| Orégano | 1.652 | 0.1449 | 0.0878 | 0 | 0.2474 |
| Romero | 0.0524 | 12.425 | 8.865 | 0.3725 | 0.0753 |

(Delgadillo-Ruiz *et al.*, 2021)

Tabla 2. Movilidad de las bacterias a diferentes concentraciones de estándares.

| Clasificación | Tratamiento | Concentración (% o mg mL ⁻¹) | Bacterias | | | |
|---|----------------|---|---------------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|
| | | | <i>Clostridium</i> spp | <i>E. coli</i> | <i>Pseudomona</i> spp | <i>Salmonella</i> spp |
| Controles | T1= Testigo | 0 | 1* | 1 | 1 | 1 |
| | T2= Alcohol | 70% | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Terpenoide | T3= Carvacrol | 0.05 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | T4= Carvacrol | 0.15 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | T5= Carvacrol | 0.75 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | T6= Limoneno | 0.05 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | T7= Limoneno | 0.15 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | T8= Limoneno | 0.75 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | T9= Linalol | 0.05 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | T10= Linalol | 0.15 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | T11= Linalol | 0.75 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | T12= Terpineno | 0.05 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | T13= Terpineno | 0.15 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | T14= Terpineno | 0.75 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| | T15= Timol | 0.05 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | T16= Timol | 0.15 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | T17= Timol | 0.75 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Aceite esencial | T18= Canela | 100% | 1 | 1 | 0 | 1 |
| | T19= Clavo | 100% | 1 | 1 | 0 | 1 |
| | T20= Eucalipto | 100% | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | T21= Menta | 100% | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | T22= Orégano | 100% | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | T23= Romero | 100% | 0 | 1 | 0 | 1 |
| % de inhibición para cada bacteria | | | 76.2 | 71.4 | 47.6 | 57.1 |

* Movilidad positiva = 1; movilidad negativa = 0

presencia de carvacrol a una concentración de 0.05 mg mL⁻¹ sin presencia de flagelos, provocando que el microorganismo crezca sin movilidad, es decir, cuando la célula bacteriana está sujeta a un estrés ocasionado por sustancias tóxicas y está en riesgo su viabilidad, la bacteria es capaz de suprimir la producción de la proteína flagelina para la formación del flagelo y conservar energía para otras funciones celulares, que pueden por lo tanto ser una táctica de supervivencia (Li *et al.*, 1993), sin embargo, a una concentración de 0.75 mg mL⁻¹ la bacteria cesa completamente la formación de estructuras de movilidad y ocurre la muerte celular (Burt *et al.*, 2007).

Como ya se mencionó anteriormente la presencia en las bacterias de flagelos y fimbrias ayudan en el proceso de adhesión e invasión del tejido en el huésped y la movilidad celular bacteriana, lo cual es la clave

para favorecer su patogenicidad y progresión de la infección. Van Alphen *et al.* (2012), indicaron que las concentraciones subinhibidoras de carvacrol en una concentración de 0.03 mg mL⁻¹ bloquean eficazmente el efecto de virulencia en *Campylobacter jejuni* al interferir con la función de los flagelos sin alterar los niveles intracelulares de ATP en la bacteria; concluyendo que sus resultados amplían el espectro de actividad antimicrobiana del carvacrol y respaldan el potencial del compuesto para su uso en nuevas estrategias de prevención de infecciones.

El limoneno, linalol y timol, presentaron el mismo comportamiento al ser evaluados con cada una de las bacterias (*Clostridium* spp, *E. coli* y *Salmonella* spp), por lo que su movilidad fue inhibida en cada una de las concentraciones (0.05, 0.15, 0.75 mg mL⁻¹) de los terpenoides, excepto para *Pseudomona* spp donde

únicamente se presentó inhibición a una concentración de 0.75 mg mL⁻¹. El timol, es estructuralmente similar al carvacrol, teniendo el grupo hidroxilo en una posición diferente en el anillo fenólico y ha demostrado tener un amplio espectro de actividad contra gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Du *et al.*, 2015), el mecanismo de acción antibacteriano sugiere que implica la disrupción de membrana externa e interna y la interacción con proteínas de la membrana bacteriana, afectando la permeabilidad de esta (Di Pasqua *et al.*, 2010).

El resultado de la inhibición de movilidad para *E. coli* y el terpenoide timol (Tabla 2) corresponde con lo reportado por Shapira and Mimran (2007) donde 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, por lo tanto, la muerte celular.

En el estudio realizado por Rasamiravaka *et al.* (2017), mostraron la inhibición de estructuras de virulencia como flagelos y fimbrias en *Pseudomona. Aeruginosa* necesarias para la formación de biopelículas, este efecto se determinó al evaluar los terpenoides cassipourol, β -sitosterol y α -amirina aislados del extracto de *Platostoma rotundifolium* (Briq.), en

concentraciones de 12,5, 50 y 50 μ M respectivamente; concluyendo que el uso del extracto de *Platostoma rotundifolium* (Briq.), apoyan el amplio uso antiinfeccioso de esta especie vegetal en la medicina tradicional de Burundi.

En el Tabla 2, se evidencia que los AE fueron los que mayor efecto de inhibición presentaron en las bacterias evaluadas, especialmente en *Pseudomona* spp ya que fue la más resistente a los compuestos terpenoides cuando fueron evaluados individualmente, sin embargo, esta bacteria fue susceptible en cada uno de los aceites esenciales.

El análisis de componentes principales mostró que el primer componente (CP1) explicó el 64.5% de la varianza total, representado por las bacterias *Clostridium* spp y *E. coli*; el segundo componente principal (CP2) representa el 25% que sumada da un total 89.5% de la varianza explicada por los dos componentes; este CP2 incluye a la bacteria *Pseudomona* spp. El tercer componente (CP3) ya solo aporta un 8%, representado por la bacteria *Salmonella* spp, que en forma conjunta sumado a los otros tres, representa casi el 98% de la varianza total (Tabla 3), por lo que solamente se utilizaron tres componentes.

Tabla 3. Valores de correlación para componentes principales.

| Variable | Valores propios (Eigenvectors) | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------|
| | CP1 | CP2 | CP3 | CP4 |
| <i>Clostridium</i> spp | 0.582637 | 0.085227 | -0.500512 | -0.634632 |
| <i>E. coli</i> | 0.600388 | -0.027290 | -0.262806 | 0.754799 |
| <i>Pseudomona</i> spp | -0.046643 | 0.995695 | 0.015651 | 0.078550 |
| <i>Salmonella</i> spp | 0.545796 | 0.024131 | 0.824727 | -0.146115 |
| varianza explicada | 0.6450 | 0.2506 | 0.0842 | 0.0202 |
| % varianza explicada acumulada | 64.50 | 89.56 | 97.98 | 100 |

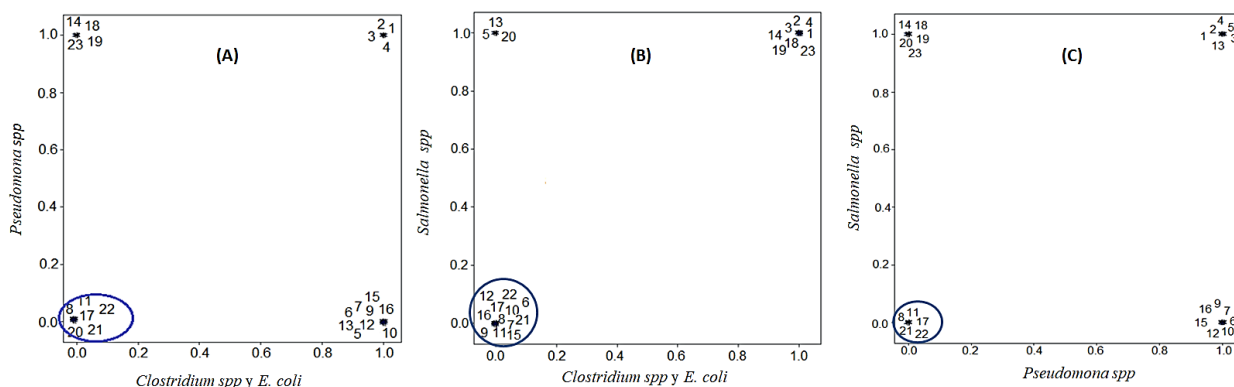


Figura 1. A) Gráfica CP1 (*Clostridium* spp y *E. coli*) y CP2 (*Pseudomona* spp), B) Gráfica CP1 (*Clostridium* spp y *E. coli*) y CP3 (*Salmonella* spp) y C) Gráfica CP2 (*Pseudomona* spp) y CP3 (*Salmonella* spp).

En las figuras 1, 2 y 3 se representan los terpenoides y aceites de plantas que mostraron un efecto inhibitorio; la coincidencia de los tratamientos que eliminaron la movilidad de las cuatro bacterias, son el 8, 11, 17, 21 y 22 que corresponden a limoneno (0.75 mg mL^{-1}), linalol (0.75 mg mL^{-1}), timol (0.75 mg mL^{-1}), aceite esencial de menta y orégano, respectivamente. Por el contrario, los tratamientos 1, 2, 3 y 4 no afectaron la movilidad bacteriana (agua, alcohol, carvacrol 0.05 y 0.15 mg mL^{-1}).

La actividad biológica neta de los AE no puede atribuirse individualmente a ninguno de los terpenoides encontrados en cada una de las plantas, por lo que la combinación y concentración de sus principios activos altera la actividad biológica en mayor medida, por ejemplo, se ha documentado que la acción insecticida del aceite de romero contra las larvas de insectos se debe al efecto combinado de varios principios activos del romero, en donde ninguno de estos compuestos cuando fueron evaluados individualmente mostraron actividad biológica (Murray *et al.*, 2008). El resultado de Murray *et al.* (2008) concuerda con lo encontrado en el presente trabajo de experimentación; ya que el aceite esencial de orégano inhibió la movilidad en cada una de las bacterias evaluadas; además de ser el AE que tiene la mayor concentración de carvacrol y timol; sin embargo cuando se evaluaron individualmente estos terpenoides no presentaron el mismo efecto, por lo que deja de manifiesto que la combinación de todos los principios activos en los AE generan sinergia y aumenta el efecto antibacteriano.

El hecho de que las bacterias patógenas en presencia de principios activos o aceites esenciales de plantas no desarrollen flagelos o fimbrias, puede tener implicaciones para el uso de estos compuestos como aditivos antibacterianos en productos alimenticios y/o para la generación de nuevos antibióticos; ya que, si la célula bacteriana no presenta estructuras asociadas a su patogenicidad y virulencia, disminuirá su capacidad de adherirse e invadir el tejido huésped. Basándose en los usos populares de las plantas medicinales de la región y la extracción de aceites esenciales y de los principios activos se pueden identificar recursos botánicos con este potencial, por lo que hace falta, documentar de manera científica un gran número de plantas que permita enriquecer esta línea de investigación.

CONCLUSIÓN

La inhibición de movilidad bacteriana en *Clostridium* spp, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp y *Pseudomonas* spp se presentó en una concentración de 0.75 mg mL^{-1} para los compuestos terpenoides limoneno, linalol y timol, así como en los aceites esenciales de menta y orégano.

Funding. This research was financed by the authors.

Conflict of interests. The authors declare that they do not have conflicts of interest.

Compliance with ethical standards. Not applicable.

Data availability. Data are available with the corresponding author (carmezlop@yahoo.com.mx), upon reasonable request.

Author contribution statement (CRediT). P.I.

Gallegos-Flores: Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **L. Delgadillo-Ruiz:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Resources, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **R. Bañuelos-Valenzuela:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Resources, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **F. Echavarría-Cháirez:** Conceptualization, Data curation, Formal Analysis, Software, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **B. Valladares-Carranza:** Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **C. Meza-López:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

REFERENCIAS

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), pp. 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bañuelos, V.R., Delgadillo, R.L., Echavarría, C.F., Delgadillo, R.O. and Meza, L.C., 2018. Composición química y FTIR de extractos etanólicos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Agrociencia*, 52(3), pp. 309–321. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v52n3/2521-9766-agro-52-03-309.pdf>
- Barken, K.B., Pamp, S.J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J.J., Klausen, M., Givskov, M., Whitchurch, C.B., Engel, J.N. and Tolker-Nielsen, T., 2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 10(9), pp. 2331–2343. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x>

- Breijyeh, Z., Jubeh, B. and Karaman, R., 2020. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*, 25(6), pp. 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
- Burt, S.A., van der Zee, R., Koets, A.P., de Graaff, A.M., van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H.P. and Veldhuizen, E.J., 2007. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), pp. 4484–4490. <https://doi.org/10.1128/AEM.00340-07>
- Debalke, D., Birhan, M., Kinubeh, A. and Yayeh, M., 2018. Assessments of Antibacterial Effects of Aqueous-Ethanollic Extracts of *Sida rhombifolia*'s Aerial Part. *The Scientific World Journal*, 2018 (8429809), pp. 1-8. <https://doi.org/10.1155/2018/8429809>
- Delgadillo-Ruiz, L., Bañuelos-Valenzuela, R., Gallegos-Flores, P., Echavarría-Cháirez, F., Meza-López, C. and Gaytán-Saldaña, N., 2021. Modificación de la fermentación ruminal *in vitro* para mitigación de metano mediante la adición de aceites esenciales de plantas y compuestos terpenoides. *Abanico Veterinario*, 11, pp. 1-12. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.9>
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G. and Mauriello, G., 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp. 2745–2749. <https://doi.org/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, pp. 4863–4870. <https://doi.org/10.1021/jf0636465>
- Di Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D. and Mauriello, G., 2010. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics*, 10, pp. 1040–1049. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900568>
- Du, E., Gan, L., Li, Z., Wang, W., Liu, D. and 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), pp. 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0055-7>
- El Ghmari, A., Latrache, H., Hamadi, F., El Louali, M., El Bouadili, A., Hakkou, A. and Bourlioux, P., 2002. Influence of surface cell structures on physicochemical properties of *Escherichia coli*. *The New Microbiológica*, 25(2), pp. 173–178.
- Fernández, L.A. and Berenguer, J., 2000. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), pp. 21–44. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00531.x>
- Friedman, M., 2014. Chemistry and Multibeneficial Bioactivities of Carvacrol (4-Isopropyl-2-methylphenol), a Component of Essential Oils Produced by Aromatic Plants and Spices: Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, pp. 7652–7670. <https://doi.org/10.1021/jf5023862>
- Gallegos-Flores, P., Bañuelos-Valenzuela, R., Delgadillo-Ruiz, L., Meza-López, C. and Echavarría-Cháirez, F., 2019. Actividad antibacteriana de cinco compuestos terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol. *Tropical and Subtropical agroecosystem*, 22(2), pp. 241-248. <https://www.revistaccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2838>
- García-García, R., López-Malo, A. and Palou, E., 2011. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science*, 76(2), pp. M95-M100. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02005.x>
- Hanson, M.S. and Brinton, C.C., 1988. Identification and characterization of *E. coli* type-1 pilus tip adhesion protein. *Nature*, 332(6161), pp. 265–268. <https://doi.org/10.1038/332265a0>
- Homma, M., DeRosier, D.J. and Macnab, R.M., 1990. Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. *Journal of Molecular Biology*, 213(4), pp. 819–832. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80266-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80266-9)
- Jarrell, K.F., Ding, Y., Nair, D.B. and Siu, S., 2013. Surface appendages of archaea: structure, function, genetics and assembly. *Life (Basel, Switzerland)*, 3(1), pp. 86–117. <https://doi.org/10.3390/life3010086>

- Kim, H.N., Hong, Y., Lee, I., Bradford, S.A. and Walker, S.L., 2009. Surface characteristics and adhesion behavior of *Escherichia coli* O157:H7: role of extracellular macromolecules. *Biomacromolecules*, 10(9), pp. 2556–2564. <https://doi.org/10.1021/bm900516y>
- Kokoska, L., Kloucek, P., Leuner, O. and Novy, P., 2019. Plant-Derived Products as Antibacterial and Antifungal Agents in Human Health Care. *Current Medicinal Chemistry*, 26(29), pp. 5501–5541. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180831144344>
- La Storia, A., Ercolini, D., Marinello, F., Di Pasqua, R., Villani, F. and Mauriello, G., 2011. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol- treated bacterial cells. *Research in Microbiology*, 162(2), pp. 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.11.006>
- Lim, S.H. and Choi, C.I., 2019. Pharmacological Properties of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) as A Promising Nutraceutical Resource. *Nutrients*, 11(2), pp. 437. <https://doi.org/10.3390/nu11020437>
- Liu, Q., Meng, X., Li, Y., Zhao, C.N., Tang, G.Y. and Li, H.B., 2017. Antibacterial and Antifungal Activities of Spices. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), pp. 1283. <https://doi.org/10.3390/ijms18061283>
- Murray, B.I., Joanne, A.W. and Rod, B., 2008. Insecticidal Activities of Commercial Rosemary Oils (*Rosmarinus officinalis*.) Against Larvae of *Pseudaletia unipuncta* and *Trichoplusia ni*. in Relation to Their Chemical Compositions. *Pharmaceutical Biology*, 46(1-2), pp. 82-87. DOI: 10.1080/13880200701734661
- Nair, J.J., Wilhelm, A., Bonnet, S.L. and van Staden, J., 2017. Antibacterial constituents of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27(22), pp. 4943–4951. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.09.052>
- Niño, J., Mosquera, O.M. and Correa, Y.M., 2012. Antibacterial and antifungal activities of crude plant extracts from Colombian biodiversity. *Revista de Biología Tropical*, 60(4), pp. 1535–1542. <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i4.2071>
- Oliveira, D.F., Pereira, A.C., Figueiredo, H.C., Carvalho, D.A., Silva, G., Nunes, A.S., Alves, D.S. and Carvalho, H.W., 2007. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. *Fitoterapia*, 78(2), pp. 142–145. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.09.027>
- Radulovic, N.S., Blagojevic, P.D., Stojanovic-Radic, Z.Z. and Stojanovic, N.M., 2013. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Current Medicinal Chemistry*, 20(7), pp. 932–952. <https://doi.org/10.2174/092986731132007008>
- Rasamiravaka, T., Ngezahayo, J., Pottier, L., Ribeiro, S.O., Souard, F., Hari, L., Stévigny, C., Jaziri, M.E. and Duez, P., 2017. Terpenoids from *Platostoma rotundifolium* (Briq.) A. J. Paton Alter the Expression of Quorum Sensing-Related Virulence Factors and the Formation of Biofilm in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), pp. 1270. <https://doi.org/10.3390/ijms18061270>
- Raut, J.S. and Karuppayil, S.M., 2014. Review A Status Review on the Medicinal Properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62(2014), pp. 250–264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Rodríguez-García, I., Silva-Espinoza, B., Ortega-Ramírez, L., Leyva, J., Siddiqui, M., Cruz-Valenzuela, M., González-Aguilar, G. and Ayala-Zavala, J., 2015. Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), pp.1717-1727. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.800832>
- Rodríguez, E.L., Marcelino, G., Silva, G.T., Figueiredo, P.S., Garcez, W.S., Corsino, J., Guimarães, R. and Freitas, K.C., 2019. Nutraceutical and Medicinal Potential of the *Morus* Species in Metabolic Dysfunctions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), pp. 301. <https://doi.org/10.3390/ijms20020301>
- Sangermani, M., Hug, I., Sauter, N., Pfohl, T. and Jenal, U., 2019. Tad Pili Play a Dynamic Role in *Caulobacter crescentus* Surface Colonization. *Molecular Biology and Physiology*, 10(3), pp. e01237-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01237-19>
- Shapira, R. and Mimran, E., 2007. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants exhibiting altered response to thymol. *Microbial Drug Resistance*, 13(3), pp. 157-165. <https://doi.org/10.1089/mdr.2007.731>

- SAS Institute Inc. 2011. SAS 9.3. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sathoff, A.E. and Samac, D.A., 2019. Antibacterial Activity of Plant Defensins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(5), pp. 507–514. <https://doi.org/10.1089/mdr.2007.731>
- Sharma, A., Flores-Vallejo, R., Cardoso-Taketa, A. and Villarreal, M.L., 2017. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 208, pp. 264–329. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.045>
- Sikkema, J., De Bont, J. and Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269, pp. 8022–8028. <http://www.jbc.org/content/269/11/8022.full.pdf>
- Silva-Vega, M., Bañuelos-Valenzuela, R., Delgadillo-Ruiz, L., Gallegos-Flores, P., Meza-López, C., Valladares-Carranza, B. and Echavarría-Cháirez, F., 2020. Caracterización química de extracto alcohólico de hoja de guayaba (*Psidium guajava*) y su efecto como inhibidor de movilidad para *Escherichia coli* O157:H7. *Abanico Veterinario*, 10(1), pp.1-13. <https://doi.org/10.21929/abavet2020.26>
- Soliman, S., Saeed, B.Q., Elseginy, S.A., Al-Marzooq, F., Ahmady, I.M., El-Keblawy, A.A. and y Hamdy, R., 2021. Critical discovery and synthesis of novel antibacterial and resistance-modifying agents inspired by plant phytochemical defense mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*, 333, pp. 109318. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109318>
- Swamy, M.K., Akhtar, M.S. and Sinniah, U.R., 2016. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2016, pp.1-21. <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N.R., Nogueira, J.M., Saraiva, J.A. and Nunes, M., 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agricultura*, 93(11), pp. 2707–2714. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6089>
- Van Alphen, L.B., Burt, S.A., Veenendaal, A.K., Bleumink-Pluym, N.M. and Van Putten, J.P., 2012. The natural antimicrobial carvacrol inhibits *Campylobacter jejuni* motility and infection of epithelial cells. *PloS one*, 7(9), pp. e45343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045343>
- Van Gerven, N., Waksman, G. and Remaut, H., 2011. Pili and flagella biology, structure, and biotechnological applications. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 103, pp. 21–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415906-8.00005-4>
- Vokou, D., Kokkini, S. and Bessiere, J.M., 1993. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21, pp. 287-295. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90047-U](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90047-U)
- Yamamoto, K., Arai, H., Ishii, M. and Igarashi, Y., 2012. Involvement of flagella-driven motility and pili in *Pseudomonas aeruginosa* colonization at the air-liquid interface. *Microbes and Environments*, 27(3), pp. 320–323. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me11322>