

Efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre la permeabilidad celular de *Salmonella enterica*



Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on cell permeability of *Salmonella enterica*

<https://eqrcode.co/a/kDfxgx>

✉ Annie Rubio Ortega^{1*}, ✉ María del Carmen Travieso Novelles¹, ✉ Yamilka Riverón Alemán³,
✉ Ailin Martínez Vasallo³, ✉ Ivette Espinosa Castaño², ✉ Oriela Pino Pérez¹

¹Laboratorio de Ecología Química, Grupo Plagas Agrícolas, Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Laboratorio de Bacteriología, Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

³Laboratorio de Ensayos para el Control de la Calidad e Inocuidad de los Alimentos (CENLAC), Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Las infecciones por *Salmonella* spp. (salmonelosis) son la segunda causa mayoritaria de enfermedades transmitidas por alimentos a nivel mundial. Ante la creciente emergencia de cepas resistentes a antibióticos, se buscan alternativas para su tratamiento. Los aceites esenciales son un poderoso recurso natural antibacteriano que necesita de mayor conocimiento en la comprensión del mecanismo de acción. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. de plantas cultivadas en Cuba sobre la permeabilidad celular de *Salmonella enterica*. En los ensayos se utilizaron una cepa de referencia y una cepa resistente a β -lactámicos. Los efectos del aceite esencial sobre la viabilidad celular a la concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinaron mediante tiempo de muerte celular. La acción del aceite esencial sobre la integridad celular se evidenció a través de la bacteriolisis, por la pérdida de contenido celular y proteínas totales liberadas. El aceite esencial de *T. vulgaris* a la CMI provocó la muerte celular en una hora de contacto para ambas cepas. Además, se demostró la salida de compuestos celulares absorbentes a 260 nm y la salida de proteínas totales de ambas cepas por acción de la esencia a dos horas de tratados, sin ocasionar lisis celular. La membrana citoplasmática se identifica como posible sitio de acción de esta esencia cubana sobre *S. enterica*, a partir de la salida de componentes celulares, lo que implica cambios estructurales a nivel celular. El aceite esencial de *T. vulgaris* es un candidato promisorio para el desarrollo de productos antibacterianos destinados al control de la salmonelosis.

Palabras clave: permeabilidad celular, aceite esencial, resistencia antimicrobiana, *Salmonella*, *Thymus vulgaris*.

ABSTRACT: Infections with *Salmonella* spp. (salmonellosis) are the second leading cause of foodborne diseases worldwide. Given the growing emergence of antibiotic resistant strains, alternatives for their treatment are being sought. Essential oils are a powerful natural antibacterial resource that requires more knowledge in understanding the mechanism of action. The objective of this work was to determine the effect of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. from plants cultivated in Cuba on the cell permeability of the *Salmonella enterica*. A reference strain and a β -lactam resistant strain were used in the trials. The effects of the essential oil on cell viability at the minimum inhibitory concentration (MIC) were determined through cell death time. The action of the essential oil on cell integrity was evidenced through bacteriolysis, loss of absorbent cell content and total proteins released. The essential oil of *T. vulgaris* at MIC caused cell death in one hour of contact for both strains. In addition, the release of absorbent cell components at 260 nm and the release of total proteins from both strains by the action of the essence were demonstrated within two hours of treatment, without causing cell lysis. The cytoplasmic membrane is identified as a possible site of action of this Cuban essence on *S. enterica*, from the release of cell components, which implies structural changes at cell level. The essential oil of *T. vulgaris* is a promising candidate for the development of antibacterial products for the control of salmonellosis.

Key words: cell permeability, essential oil, antimicrobial resistance, *Salmonella*, *Thymus vulgaris*.

*Autor para la correspondencia: Annie Rubio Ortega. E-mail: annie@censa.edu.cu.

Recibido: 29/08/2020

Aceptado: 01/11/2020

INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella* se encuentra entre los principales patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) a nivel mundial (1). Existen más de 2 500 serovares de *Salmonella enterica* (2), con un amplio rango de hospederos. También se multiplican en tejidos vegetales (3). Esta especie tiene la capacidad de adquirir resistencia a antibióticos y de formar biopelículas (4,5,6), elementos que la incluyen en el listado de patógenos de prioridad de la OMS para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos para su control (7).

Los aceites esenciales, mezclas naturales usualmente formadas por numerosos metabolitos secundarios, poseen actividad como antimicrobianos, incluso sobre cepas resistentes a antibióticos (8,9). El aceite esencial de *Thymus vulgaris* L., planta conocida popularmente como tomillo, se utiliza desde la edad antigua como condimento, aroma y preservante de alimentos (10). El aceite de tomillo es rico en compuestos fenólicos como timol, carvacrol y γ -terpineno, componentes que le confieren una potente actividad antibacteriana de amplio espectro de acción (8). Esta esencia obtenida de plantas cultivadas en Cuba inhibe el crecimiento de cepas de *S. enterica*, incluso inhibe cepas resistentes a antibióticos β -lactámicos (ampicilina, cefazolina, y cefoxitina) (11).

Los estudios sobre actividad antimicrobiana de los aceites esenciales son abundantes a nivel mundial; sin embargo, se necesita de mayor profundidad en la temática sobre el modo de acción de estos productos naturales como antimicrobianos (12). El conocimiento sobre los mecanismos de acción es fundamental para contrarrestar la resistencia antimicrobiana. Si bien es necesario una alternativa para tratar la resistencia a un antibiótico, los estudios de modo de acción crean la base para prevenir un daño mayor por sobreexposición a compuestos con el mismo modo de acción. El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos del aceite esencial de *T. vulgaris* de plantas cultivadas en Cuba sobre la permeabilidad celular de *S. enterica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Se emplearon las cepas: *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC14028 y *S. enterica* subsp. *enterica* resistente a ampicilina, cefazolina y cefoxitina (datos no publicados). Ambas forman parte del cepario del CENLAC (Laboratorio de Ensayos para el Control de la Calidad e Inocuidad de los Alimentos) del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

Aceite esencial y cepas bacterianas

El aceite esencial de *T. vulgaris* se obtuvo por el método de hidrodestilación durante tres horas, empleando un equipo Clevenger (13). Este aceite se utilizó a la concentración mínima inhibitoria (CMI) 1 mg/mL que coincide con la concentración mínima bactericida (CMB) para las cepas de *Salmonella* spp. estudiadas a partir de previa determinación (11).

Tiempo de muerte celular

Los cambios en la viabilidad de las cepas de *S. enterica*, en dependencia del tiempo de exposición al aceite esencial de *T. vulgaris*, se determinaron usando una modificación del método de Miles y Misra (14). Una suspensión de células de concentración 15×10^6 UFC/mL de cada cepa fue preparada en solución salina al 0,85 % (SS) según escala de McFarland a partir de un cultivo en el medio caldo nutriente (CN, Biocen, Cuba) de 24 h de incubación a 36°C. Se mezcló 1:1 con CN que contenía el aceite esencial de *T. vulgaris* a 2xCMI, en tubos eppendorff de 1,5 mL para una concentración final de 5×10^5 UFC/mL. La concentración final del aceite en los tratamientos fue de 1 mg/mL. Por la poca solubilidad del aceite en el medio, se empleó como disolvente Tween 80 (Sigma Aldrich, Alemania) (0,1 %). Como control se usó la suspensión de células bacteriana de ambas cepas en CN con el disolvente empleado. Las muestras se incubaron a 36°C con agitación a 17,8 rad/s (incubadora con zaranda IKA® KS 4000 i control). Se tomaron muestras a tiempo 0, 1, 2, 4 y 8 horas de incubación. Las muestras se centrifugaron a 5236 rad/s durante 10 minutos; se

eliminó el sobrenadante, se realizó lavado con 100 μ L de SS y posterior centrifugación. Las células se resuspendieron en 100 μ L de solución salina, se realizaron las diluciones seriadas en base 10 de cada muestra y 20 μ L se sembraron en dos placas de agar nutriente (AN, BioCen, Cuba) y se incubaron a 36°C por 24 h. Se realizaron tres determinaciones independientes. Los valores de UFC se estimaron multiplicando el número de UFC obtenido por placa por el factor de la dilución seriada correspondiente. Los datos se expresaron como la media del logaritmo en base 10 de las UFC (\log_{10} UFC /mL) (media \pm DS).

Integridad celular

El ensayo de bacteriolisis se realizó acorde con el método estándar descrito por Carson *et al.* (15), con algunas modificaciones. De cada cepa a evaluar se preparó una suspensión bacteriana en solución salina de $1,2 \times 10^9$ UFC/mL equivalente a una densidad óptica (DO), según la escala de McFarland, a partir de un cultivo de 24 h de incubación en AN a 36°C. Luego, este inóculo se centrifugó a 3750 g por 10 minutos y se lavó dos veces con SS y, finalmente, se resuspendió en SS con Tween 80 (0,1 %, v/v). La suspensión bacteriana se ajustó a 9×10^8 UFC/mL (McFarland) y se mezcló 1:1 con SS que contenía el aceite esencial de *T. vulgaris* a 2xCMi, en tubos eppendorff de 1,5 mL, para una densidad de células final de 5×10^8 UFC/mL. Se empleó como disolvente Tween 80 (0,1 %, v/v). Se utilizaron como controles las suspensiones de las células bacterianas de cada cepa en SS con el disolvente. Los tratamientos se incubaron a 36°C con agitación a 17,8 rad/s durante cuatro horas. Se tomaron muestras de 1 mL a tiempo 0, 1, 2 y 4 horas de incubación. Las muestras se centrifugaron a 5236 rad/s por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en SS. Luego se determinó la densidad óptica (DO) a 620 nm. Cada muestra se preparó por triplicado y se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados se mostraron como la relación de la DO_{620} de cada tiempo entre la DO_{620} en tiempo 0, expresados en porcentaje.

Pérdida de contenido celular

La pérdida de contenido celular se determinó por medición de DO a 260 nm. La preparación del inóculo y de las muestras se realizó igual que en el ensayo anterior para cada cepa. Las muestras se incubaron a 36°C con agitación a 17,8 rad/s. Se tomaron muestras a tiempo 0, 1, 2 y 4 horas de incubación. Las muestras se centrifugaron a 5236 rad/s por 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se midió DO a 260 nm. Cada muestra se preparó por triplicado y se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados se expresaron como sustracción de la DO_{260} de cada tiempo menos la DO_{260} en tiempo 0.

Determinación de proteínas totales liberadas

La pérdida de proteína totales liberadas por acción del aceite esencial de *T. vulgaris* se determinaron por el método de Lowry (16). La preparación del inóculo y de las muestras se realizó igual que en el ensayo anterior. Se incubaron durante 1 h a 36°C con agitación a 17,8 rad/s. Las muestras se centrifugaron a 5236 rad/s por 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se agitó por 20 s en agitador de tubos Vortex mixer. Una alícuota de 100 μ L de cada muestra se diluyó en 100 μ L de agua destilada (1:1) y se añadió 1 mL de solución de Lowry (Sigma, Alemania). Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 100 μ L del reactivo de Folin (Sigma), con posterior incubación por 30 minutos. Se midió la DO a 730 nm. Se utilizó el SDS al 1 % y se empleó Albúmina de suero bovino como patrón. Cada muestra se preparó por triplicado y se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados se expresaron como la media de concentración \pm error estándar.

Análisis estadístico

Los datos experimentales obtenidos se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza simple, y las medias se compararon mediante la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan a una probabilidad de error al 5 % ($p < 0,05$), usando el paquete estadístico

InfoStat/L versión de 2018 (17). Para los resultados del ensayo de pérdida de contenido celular, las medias se analizaron por intervalos de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tiempo de muerte celular

La cinética de muerte celular de las cepas *S. enterica* (ATCC) y *S. enterica* por acción del aceite esencial de *T. vulgaris* a la CMI se muestra en la Figura 1. Para ambas cepas, el tratamiento control se mantuvo con una cinética de pendiente positiva indicando el crecimiento celular y alcanzó valores en un rango 9-10 log₁₀ UFC/mL. Mientras que, en presencia del aceite esencial de *T. vulgaris* a la CMI, se muestra una pendiente negativa, que demuestra la acción bacteriolítica de la esencia. La muerte celular para más del 98 % de la carga inicial de células se observó en la primera hora de tratamiento para ambas cepas. Este efecto se acentúa a las 2 horas, sin recuperación en 24 horas (datos no mostrados). Estos resultados demuestran la potencialidad de

la esencia del tomillo de origen cubana sobre este patógeno, incluso frente a una cepa que evidenció resistencia a diferentes familias de antibióticos.

Integridad celular

Para deducir de forma preliminar el posible daño en la membrana de ambas cepas de *S. enterica*, debido a la acción del aceite esencial de *T. vulgaris*, se compararon los porcentos de DO del tratamiento sobre cada cepa durante el periodo del tiempo evaluado con respecto al obtenido en el tiempo inicial (Fig. 2). En ambas cepas, en ausencia del aceite esencial, el tratamiento control se mantuvo sin mostrar diferencias; aunque, como se observa en el gráfico, existe una leve disminución de sus proporciones en el tiempo, que se ajusta a la etapa de latencia de la bacteria. En presencia del aceite esencial se observó la disminución de la DO en el tiempo para ambas cepas, lo que evidencia el efecto inhibitor del aceite sobre la multiplicación celular.

En las suspensiones bacterianas de *S. enterica* de ambas cepas, con una hora de tratamiento con

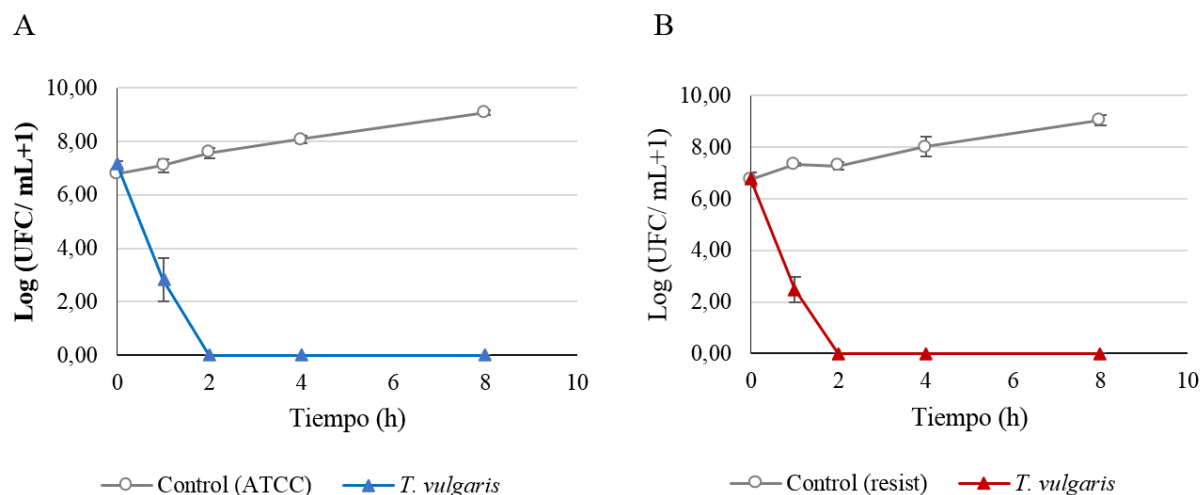


Figura 1. Tiempo de muerte celular de cepas de *Salmonella enterica* por acción del aceite esencial de *Thymus vulgaris*. A) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC14028 (ATCC), control (sin aceite) línea con círculos y tratamiento con el aceite esencial de *T. vulgaris* a la CMI línea con triángulos. B) *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, control (sin aceite) línea con círculos y tratamiento con el aceite esencial de *T. vulgaris* a la CMI línea con triángulos. Datos representados: Media \pm error estándar, n=6. / Cell death time of *Salmonella enterica* strains by the action of the essential oil of *Thymus vulgaris*. A) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC14028 (ATCC), control (without oil) with circles and treatment with the essential oil of *T. vulgaris* at MIC line with triangles. B) *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, control (without oil) with circles and treatment with the essential oil of *T. vulgaris* at MIC line with triangles. Data represented: Mean \pm standard error, n=6.

el aceite esencial de *T. vulgaris*, a la CMI, se detectó una disminución de la densidad óptica, con cambios significativos estadísticamente solo para las células de la cepa ATCC. Sin embargo, durante las dos primeras horas de tratamiento a la CMI, no se induce cambios significativos de lisis celular para ambas cepas. Los comportamientos observados con valores por encima del 80 % sugirieren que no existe daño aparente en la membrana celular durante este tiempo, aunque transcurridas 2 h de evaluación ya se había cumplido el tiempo de muerte celular demostrado anteriormente.

En la cepa de *S. enterica* (resistente), solo se muestran diferencias significativas en cuanto a los valores de % de DO, debido a la acción del aceite esencial con respecto al control, a las cuatro horas de tratamiento, lo que coincide con un efecto de lisis celular en la población

bacteriana de esta cepa; mientras que la esencia de *T. vulgaris* provoca la lisis de las células de la cepa ATCC a las cuatro horas de tratamiento, con valores inferiores al 50 %.

Estos resultados sugieren que la esencia de *T. vulgaris* a la CMI afecta la permeabilidad celular de cepas de *Salmonella enterica* en una hora de tratamiento. Efecto similar a este se obtuvieron por Guinoiseau *et al.* (18) con la fracción oxigenada del aceite esencial de *Cistus ladaniferus* sobre *Staphylococcus aureus*, transcurrido 30 minutos de tratamiento. La acción de los aceites esenciales se les atribuye, en gran medida, a los compuestos oxigenados como los fenólicos (19). Las esencias de *T. vulgaris* se caracterizan por la presencia de compuestos fenólicos como componentes mayoritarios, como el timol (8).

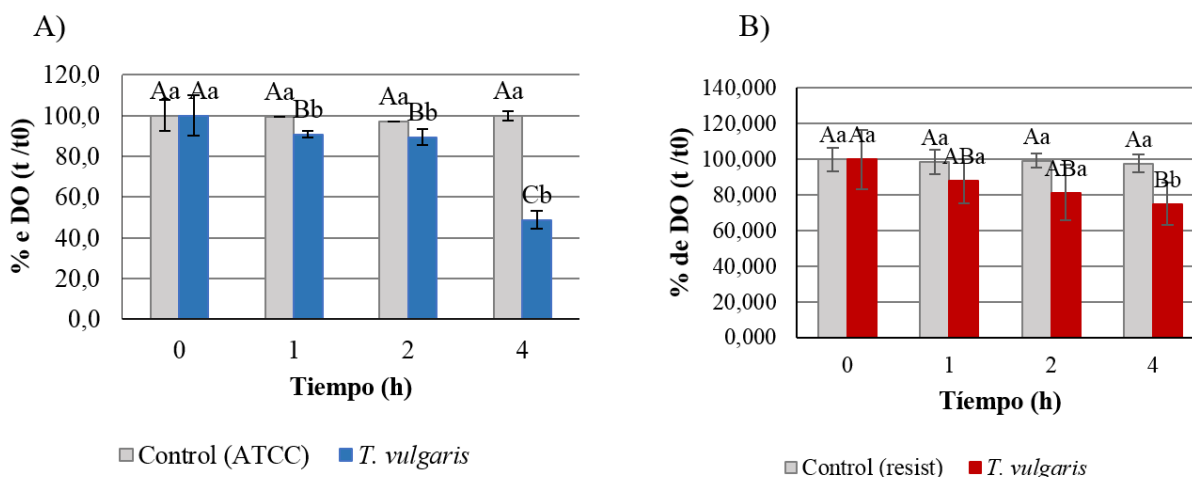


Figura 2. Integridad celular de cepas de *Salmonella enterica* por acción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* a la CMI, por medición de la densidad óptica (DO) a 620 nm, en el tiempo. A) Cepa *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC14028 (ATCC), control (sin aceite) en barra gris y tratamiento con el aceite esencial en barra azul. B) *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, control (sin aceite) en barra gris y tratamiento con el aceite esencial en barra roja. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las medias de DO de un tratamiento en el tiempo ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las DO de los tratamientos en un tiempo ($p < 0,05$). Datos representados: Media del por ciento \pm error estándar, $n=9$./ *Cell integrity of Salmonella enterica strains by the action of the essential oil of Thymus vulgaris at MIC, by measuring the optical density (OD) at 620 nm, over time. A) Salmonella enterica strain subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC14028 (ATCC), control (without oil) in gray bar and treatment with the essential oil in blue bar. B) Salmonella enterica subsp. enterica, control (without oil) in gray bar and treatment with the essential oil in red bar. Different capital letters indicate significant differences between the mean OD of a treatment over time ($p < 0.05$). Different lower case letters indicate significant differences between the ODs of treatments over time ($p < 0.05$). Data represented: Mean percent \pm standard error, $n=9$.*

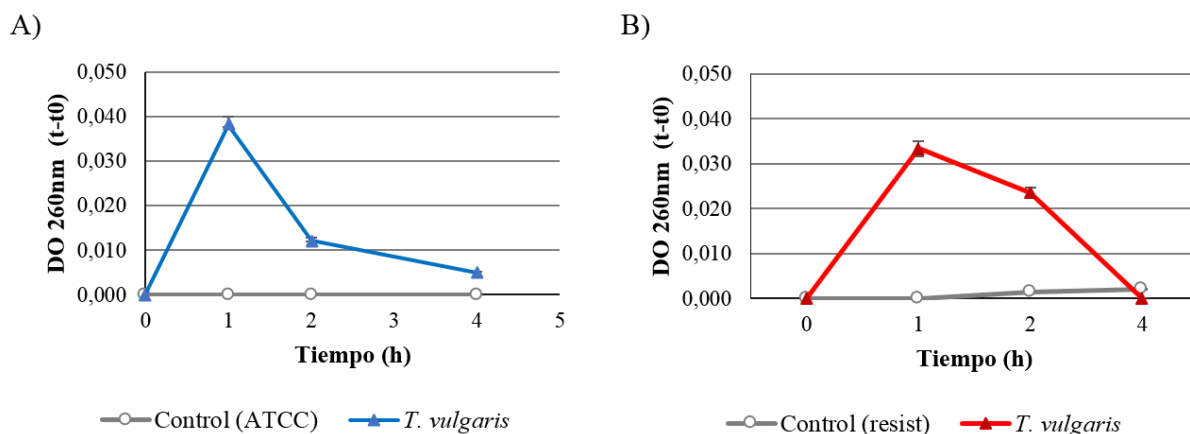


Figura 3. Cinética de pérdida de contenido celular que absorbe a 260 nm de cepas de *Salmonella enterica* por acción del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, por medición de la densidad óptica (DO) de los tratamientos en el tiempo. A) Cepa *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC14028 (ATCC), control (sin aceite) en línea con círculos y tratamiento con el aceite esencial de *T. vulgaris*, a la CMI, línea con triángulos. B) *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, cepa resistente a β -lactámicos (resist), control (sin aceite) en línea con círculos y tratamiento con el aceite esencial de *T. vulgaris*, a la CMI, línea con triángulos. Datos representados: Medias de la sustracción de DO \pm error estándar, n=9./ *Kinetics of loss of cell content absorbed at 260 nm from strains of Salmonella enterica by the action of the essential oil of Thymus vulgaris, by measuring the optical density (OD) of the treatments over time. A) Salmonella enterica strain subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC14028 (ATCC), control (without oil) in line with circles and treatment with the essential oil of T. vulgaris, at MIC, line with triangles. B) Salmonella enterica subsp. enterica, strain resistant to β -lactams (resist), control (without oil) in line with circles and treatment with the essential oil of T. vulgaris, to MIC, line with triangles. Data represented: OD subtraction averages \pm standard error, n=9.*

Pérdida de contenido celular

La pérdida de componentes celulares ante la acción de agentes bacterianos es un indicador de posible daño en la membrana celular. El aceite esencial de *T. vulgaris* a la CMI provocó la pérdida de contenido celular, específicamente de material que absorbe a 260 nm de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 transcurrida 1 h de tratamiento (Fig. 3). Esto se corresponde con el resultado obtenido en el ensayo de integridad celular, donde el aceite de *T. vulgaris* provoca disminución de la población bacteriana en la cepa ATCC desde la hora de tratamiento. El control se mantuvo sin salida de material celular, lo que sugiere un buen estado de la integridad de la membrana.

La absorción a 260 nm se emplea para determinar la presencia de ácidos nucleicos. Las estructuras purificadas de la membrana plasmática, la membrana externa, el peptidoglicano y la cápsula polisacáridica de las bacterias no contienen bases de ácidos nucleicos y no tienen absorción a 260 nm. La presencia de

ácidos nucleicos en el contenido extracelular sugiere que ha ocurrido daño en la barrera selectiva al intercambio con el medio y puede reflejarse con mayor proporción ante la muerte celular (20).

La porción de componentes liberados depende del microorganismo (según su fisiología y composición de sus membranas), del tipo agente antibacteriano (aceites esenciales como mezclas de compuestos) y factores que afectan la eficacia de la actividad bactericida (concentración y temperatura) (21). Bajpai *et al.* (22) demostraron la salida de componentes celulares de *Escherichia coli* a partir de la acción del aceite esencial de *Taxus cuspidata*. Estos resultados fueron similares a los alcanzados con el aceite esencial de *T. vulgaris* de origen cubano sobre ambas cepas de *Salmonella* spp.

En correspondencia con la salida de material citoplasmático absorbente a 260, la esencia de *T. vulgaris* a la CMI promueve la salida de proteínas totales del material citoplasmático de las cepas de *S. enterica* estudiadas, transcurrida 1 h de tratamiento (Fig. 4). La mayor salida de

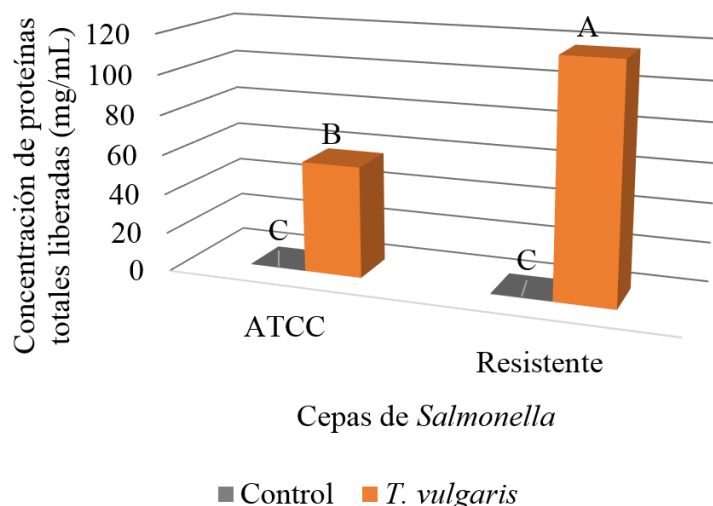


Figura 4. Proteínas totales liberadas de las cepas de *Salmonella enterica* por acción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* a la CMI. Cepas *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC14028 (ATCC) y cepa *S. enterica*, control (sin aceite) en barra gris y tratamiento con el aceite esencial de *T. vulgaris* en barra anaranjada. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medias de concentración de proteínas totales liberadas transcurrida 1 h de tratamiento con la esencia. Datos representados: Medias de la concentración de proteínas totales liberadas (mg/mL), $n=9$./ *Total proteins released from Salmonella enterica strains by the action of the essential oil of Thymus vulgaris at MIC. Salmonella enterica strains subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC14028 (ATCC) and S. enterica strain, control (without oil) in gray bar and treatment with the essential oil of T. vulgaris in orange bar. Different capital letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the average concentration of total proteins released after 1 h of treatment with the essence. Data represented: Mean concentration of total proteins released (mg/mL), $n=9$.*

proteínas se detectó en la cepa *S. enterica*, lo que sugiere mayor sensibilidad de esta ante la acción de la esencia.

La salida de componentes celulares ratifica el daño a la integridad celular, ya sea por ruptura o por modificaciones estructurales de la membrana, que conllevan a un aumento de la permeabilidad y, con ella, a la salida de los componentes internos. Según los resultados obtenidos en la evaluación de la integridad celular y la salida de componentes por acción del aceite esencial de *T. vulgaris*, es posible la inducción de cambios estructurales en la pared y la membrana celular que conllevan a la muerte sin ocasionar aparente ruptura de la membrana transcurrida una hora de tratados. Estos resultados sugieren la membrana bacteriana de *S. enterica* como uno de los sitios de acción en ambas cepas. Se necesitan investigaciones con métodos más sensibles para determinar las moléculas dianas ante la acción del aceite sobre la membrana externa de *S. Typhimurium* e identificar el daño en la estructura del lipopolisacárido o en las proteínas de membrana.

La membrana citoplasmática es el primer sitio diana para iniciar los estudios de modo de acción de una sustancia con potencial antibiótico. Esta estructura interviene en varios procesos de conversión de energía, procesamiento de nutrientes, síntesis de macromoléculas estructurales, secreción de señales reguladoras, homeóstasis intracelular de componentes citosólicos y, por ende, del pH intracelular (19).

Las bacterias Gram negativas poseen dos membranas, la membrana celular citoplasmática y la membrana externa. La pared celular en Gram negativas contiene la membrana externa y una fina capa de peptidoglicano (10-20 %). La superficie interna de la pared está separada de la membrana celular por un espacio periplásmico amplio, que permite la estancia de toxinas y enzimas en concentraciones suficientes para la defensa bacteriana (23).

La monocapa externa de la membrana contiene lipopolisacáridos (LPS) hidrofílicos como el principal componente lipídico. Estos constituyen una barrera contra macromoléculas y compuestos

hidrofóbicos, lo que otorga mayor tolerancia a compuestos antimicrobianos hidrofóbicos como los componentes de aceites esenciales (12). La monocapa de LPS, está compuesta por lípidos aniónicos expuestos en la superficie de las membranas bacterianas y son una especie lipídica exclusiva de las bacterias Gram negativas (24). Esta propiedad es utilizada por agentes antimicrobianos catiónicos (DPK-060, LTX-109, brilacidina, XF-73 exhibits), por lo que tienen una mayor selectividad para las membranas bacterianas (25).

Los resultados sugieren la posible acción del aceite esencial sobre la membrana bacteriana, con cambios en la permeabilidad y salida de componentes celulares, aunque el modo de acción de la esencia *T. vulgaris* sobre *S. enterica* puede abarcar más de un mecanismo de acción de los descritos para antibióticos sintéticos dirigidos a esta estructura. Entre los mecanismos de acción de los antibióticos sintéticos sobre la membrana se incluyen los que provocan pérdida de la permeabilidad de la membrana externa como las polimixinas y los que generan cambios en las propiedades o modificaciones de la curvatura o por agrupamiento de fosfolípidos específicos (daptomicina, telomicina, duramicina, cinnamicina, lisocina E). Sin embargo, la efectividad de los agentes sintéticos es limitada, pues estos también se ven afectados por el aumento de los mecanismos de resistencia como incremento en la expresión de β -lactamasas bacterianas que inactivan los β -lactámicos o disminución de la absorción de medicamentos y la inactivación de antibióticos (23).

Por su naturaleza hidrofóbica, los aceites esenciales difunden a través de las membranas celulares (26) y el modo de acción; de forma general no se corresponde con un sitio o mecanismo de acción específico, sino con el daño múltiple en las células que finaliza en la muerte celular (27,28). El efecto antibacteriano puede deberse a: I) la compleja composición química que presentan, donde cada componente puede actuar por diferentes sitios y mecanismos; II) un mismo componente puede actuar por disímiles vías; y III) la acción aditiva o sinérgica de varios constituyentes sobre uno o múltiples sitios diana, lo que implica que compuestos que se encuentren en concentraciones menores potencien la

actividad de otros (29,30). Esto representa una ventaja para la utilización de *T. vulgaris* como productos para combatir la salmonelosis, pues la probabilidad de desarrollo de resistencia es menor que con el uso de antibióticos sintéticos, elemento importante para la obtención de antimicrobianos competitivos en el mercado.

CONCLUSIONES

El aceite esencial de *T. vulgaris* de plantas cultivadas en Cuba a la CMI provoca la muerte celular de *S. enterica* en 1 hora de contacto, incluso sobre la cepa resistente. La salida de componentes celulares absorbentes a 260 nm y proteínas totales por acción de la esencia, sin ocasionar lisis celular, evidencia alteraciones en la permeabilidad que señalan a la membrana citoplasmática como probable sitio de acción de esta esencia cubana sobre *Salmonella enterica*. Se requieren de otros ensayos para corroborar las modificaciones que ocurren en la membrana citoplasmática, así como sobre otras estructuras celulares. Los resultados corroboran que el aceite esencial de *T. vulgaris* es un candidato promisorio para el desarrollo de productos antibacterianos destinados al control de la salmonelosis.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la disposición y colaboración del personal de los laboratorios de Bacteriología Vegetal y Animal, CENLAC y los Laboratorios de Control de la Calidad del CENSA. En especial se les agradece a Amalia Núñez Drake y Gisleibys Miranda Silva, por la ayuda brindada en la realización de este trabajo. Se agradece a Ileana Miranda Cabrera por su apoyo en el análisis estadístico y Cecil González en la extracción del aceite esencial.

REFERENCIAS

1. OMS. Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria. Vol. 14, World Health Organization. 2015.
2. Boore AL, Hoekstra RM, Iwamoto M, Fields PI, Bishop RD, Swerdlow DL. Salmonella enterica infections in the United States and assessment of coefficients of variation: A

- Novel approach to identify epidemiologic characteristics of individual serotypes, 1996-2011. *PLoS One*. 2015;10(12):1-11.
3. Dougnon TV, Boris L, Deuguenon E, Hounmanou G, Agbankpe J, Amadou A, et al. Pathogenicity, epidemiology and virulence factors of *Salmonella* species: A review. *Not Sci Biol*. 2017;9(4):460.
 4. Cardoen S, Van Huffel X, Berkvens D, Quoilin S, Ducoffre G, Saegerman C, et al. Evidence-based semiquantitative methodology for prioritization of foodborne zoonoses. *Foodborne Pathog Dis*. 2009;6(9):1083-1096.
 5. Doyle M, Acheson D, Newland J, Dwelle T, Flynn W, Scott HM, et al. Enhancing practitioner knowledge about antibiotic resistance: connecting human and animal health. *Food Prot Trends*. 2016;36:390-394.
 6. Morganti M, Bolzoni L, Pongolini S, Scaltriti E, Casadei G, Carra E, et al. Rise and fall of outbreak-specific clone inside endemic pulsotype of *Salmonella* 4,[5],12:i:-; insights from high-resolution molecular surveillance in Emilia-Romagna, Italy, 2012 to 2015. *Eurosurveillance*. 2018;Special ed:42-52.
 7. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2017;18(3):318-327.
 8. Preedy VR. *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Academic Press; 2015.
 9. Miladi H, Zmantar T, Kouidhi B, Chaabouni Y, Mahdouani K, Bakhrouf A, et al. Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. Vol. 104, *Microbial Pathogenesis*. 2017.
 10. Nagoor Meeran MF, Javed H, Al Tae H, Azimullah S, Ojha SK. Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: Prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. *Front Pharmacol*. 2017;8:380.
 11. Rubio-Ortega A, Travieso-Novelles M, Riverón- Alemán Y, Peña-Rodríguez J, Espinosa-Castaño I, Pino-Pérez O. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de plantas cultivadas en Cuba sobre cepas de *Salmonella enterica*. *Rev Salud Anim*. 2018;40(3):1-10.
 12. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol*. 2012;312. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012. e.
 13. Pino O, Sánchez Y, Rojas MM, Abreu Y, Correa TM. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. *Rev Protección Veg*. 2012;27(3):181-187.
 14. Miles AA, Misra SS, Irwin JO. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiol Infect*. 1938;38(6):732-749.
 15. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):1914-1920.
 16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-275.
 17. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. *InfoStat*. Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2018.
 18. Guinoiseau E, Luciani A, De Rocca Serra D, Quilichini Y, Berti L, Lorenzi V, et al. Primary mode of action of *Cistus ladaniferus* L. essential oil active fractions on *Staphylococcus aureus* strain. *Adv Microbiol*. 2015;5(5):881-890.
 19. Swamy MK, Sayeed Akhtar M, Sinniah UR, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2016;1-21.
 20. Barton LL. Structural and functional relationships in prokaryotes. *United States of America*. 2005. pp.40-42.
 21. Maillard JY. Bacterial target sites for biocide action. *J Appl Microbiol Symp Suppl*. 2002;92:16S-27S.
 22. Bajpai VK, Sharma A, Moon B, Baek KH. Chemical composition analysis and antibacterial mode of action of *Taxus*

- cuspidata leaf essential oil against foodborne pathogens. *J Food Saf.* 2014;34:9-20.
23. Black J. *Microbiology: principles and explorations.* 8th ed. United States of America: John Wiley & Sons, Inc. 2012. pp. 60-67.
24. Epand RM, Walker C, Epand RF, Magarvey NA. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1 de mayo de 2016;1858(5):980-987.
25. Kintz E, Heiss C, Black I, Donohue N, Brown N, Davies MR, et al. Salmonella enterica serovar Typhi lipopolysaccharide O-antigen modification impact on serum resistance and antibody recognition. *Infect Immun.* 2017;85:e01021-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.01021-16>.
26. Reyes-Jurado F, Navarro-Cruz AR, Ochoa-Velasco CE, Palou E, López-Malo A, Ávila-Sosa R. Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;1-10.
27. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(2):446-475.
28. Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control.* 2015;54:111-119.
29. Langeveld WT, Veldhuizen EJAA, Burt SA. Synergy between essential oil components and antibiotics: A review. *Crit Rev Microbiol.* 28 de febrero de 2014;40(1):76-94.
30. Saad NY, Muller CD, Lobstein A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal.* 2013.

Conflicto de Intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses relacionados con el presente artículo.

Contribución de los autores: **Annie Rubio Ortega:** diseñó y ejecutó los ensayos, realizó el análisis estadístico y escribió el documento. **María del Carmen Travieso Novelles:** participó en el análisis y discusión de resultados. **Yamilka Riverón Alemán:** realizó los ensayos. **Ailin Martínez Vasallo:** participó en el análisis de los resultados y en la revisión del documento. **Ivette Espinosa Castaño:** diseñó los ensayos; participó en el análisis de los resultados y en la revisión del documento. **Oriela Pino Pérez:** participó en el diseño de los ensayos, en el análisis de los resultados y en la revisión del documento. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final del documento.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)