

Aplicación de aceites esenciales de plantas medicinales aromáticas para la inhibición del *quorum sensing* y la formación de *biofilm* en *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis y *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium

Yuliany Torcoroma Guillín Rincón

Trabajo de Grado para Optar el título de Biólogo

Director

Rodrigo Gonzalo Torres Sáez

PhD. Bioquímica y biología molecular

Codirector

Marlon Yesid Cáceres Ortíz

MSc. Ciencias básicas biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2019

Dedicatoria

A mi familia por su amor incomparable y su apoyo incondicional a lo largo de este camino.

“Lo que importa verdaderamente en la vida no son los objetivos que nos marcamos, sino los caminos que seguimos para lograrlos”.

Peter Bamm

Agradecimientos

A mis abuelos por su amor

A mis padres por ser mi razón de ser

A mi hermano por su acompañamiento en cada una de mis metas

A Eder por ser parte de mi camino profesional y por su cariño incondicional

A Marlon por todas las palabras de aliento y enseñanzas brindadas

A la Doctora Claudia y al Doctor Rodrigo por darme la oportunidad de aprender y forjarme en el camino como científica.

A mis amigos por hacer parte de todo este proceso

A los profesores de Biología por cada uno de los aportes brindados para enriquecer mi trayectoria como profesional.

Contenido

Introducción	12
1. Objetivos	15
1.1 Objetivo general	15
1.2 Objetivos específicos	15
2. Marco teórico	16
2.1 <i>Salmonella</i> sp.....	16
2.2 Formación de <i>biofilm</i> y <i>quorum sensing</i>	18
2.3 Compuestos de plantas medicinales como antimicrobianos	20
2. Materiales y métodos	21
3.1 Material vegetal y extracción.....	21
3.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	23
3.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales <i>in vitro</i> sobre células planctónicas.....	24
3.4 Inhibición de Formación de <i>biofilm in vitro</i>	25
3.5 Inhibición de <i>quorum sensing</i> por aceites esenciales	25
3.6 Evaluación de la citotoxicidad de los aceites esenciales usando modelos de líneas eucariotas... 26	
3.7 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	27
3.8 Análisis de la expresión de genes involucrados en <i>quorum sensing</i> y en la formación del <i>biofilm</i>	28
3.9 Extracción de ARN y análisis transcripcional	28
4.0 Análisis estadístico	29
4. Resultados	29
4.1 Material vegetal y extracción.....	29
4.2 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales <i>in vitro</i> sobre células planctónicas.....	33
4.3 Inhibición de Formación de <i>biofilm in vitro</i>	35
4.4 Inhibición de <i>quorum sensing</i> por aceites esenciales	37
4.5 Evaluación de la citotoxicidad de los aceites esenciales usando modelos de líneas eucariotas... 39	
4.6 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	41
4.7 Análisis de la expresión de genes involucrados en <i>quorum sensing</i> y en la formación del <i>biofilm</i>	43

5. Discusión..... 44

6. Conclusiones..... 49

Bibliografía..... 51

Lista de tablas

Tabla 1. Composición química (%) de los aceites esenciales 31

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los 15 AE frente a *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* ATCC 13076. Los valores están expresados en mg/mL y cada experimento fue llevado a cabo por triplicado..... 34

Tabla 3. Efecto de los AE sobre la formación del *biofilm* en *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* ATCC 13076. El porcentaje de inhibición fue calculado respecto al control (microorganismos sin tratamiento del AE). (ND) Actividad anti-biofilm no detectada..... 36

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los 15 AE sobre *Chromobacterium violaceum* CV026. Los valores están expresados en mg/mL, cada experimento fue llevado a cabo por triplicado..... 37

Tabla 5. Concentración inhibitoria (IC50) e índice de selectividad (SI) de los AE. (ND) Actividad anti-*biofilm* no detectada. 41

Lista de figuras

Figura 1. Efectos de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* quimiotipo Timol (LOT), *Lippia origanoides quimiotipo carvacrol* (LOC) y *Thymus vulgaris* (TV) en la formación de *biofilm* en *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium (A) y *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis (B). *P<0.05. 37

Figura 2. Porcentaje de inhibición de la producción de violaceína en *Chromobacterium violaceum* CV026 tratado con concentraciones sub-inhedorias AE de *Lippia origanoides carvacrol*. * P <0.05. 39

Figura 3. Efecto de la viabilidad celular de células Vero (riñón de mono verde africano, ATCC N° CCL-81) al ser tratadas con diferentes concentraciones de aceites esenciales (1.5 mg/mL- 0.37 mg/mL). * P <0.05. 40

Figura 4. Micrografías del *biofilm* de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* sobre cupones de vidrio esmerilado obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). (A) *Biofilm* de *S. Enteritidis* sin tratamiento. (B) *Biofilm* de *S. Enteritidis* tratado con concentraciones sub-inhedorias del AE LOC. (C) *Biofilm* de *S. Typhimurium* sin tratamiento. (D) *Biofilm* de *S. Typhimurium* tratado con concentraciones sub-inhedorias del AE LOC 42

Resumen

TÍTULO: APLICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS MEDICINALES AROMÁTICAS PARA LA INHIBICIÓN DEL *QUORUM SENSING* Y LA FORMACIÓN DE *BIOFILM* EN *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis Y *salmonella enterica* serovariedad Typhimurium*

AUTOR: YULIANY TORCOROMA GUILLÍN RINCÓN**

PALABRAS CLAVES: ACEITES ESENCIALES, *BIOFILM*, *QUORUM SENSING*, *Salmonella*

DESCRIPCIÓN:

La aparición de microorganismos resistentes a múltiples fármacos representa un desafío mundial, debido a la escasez de nuevos agentes antimicrobianos efectivos. Por lo tanto, se hace necesario la búsqueda de nuevos compuestos que permitan el tratamiento de estos microorganismos patógenos; en este contexto, los aceites esenciales (AE) de plantas aromáticas medicinales han generado resultados prometedores. En este estudio, se evaluó el potencial biológico de 15 AE sobre *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076 y *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium ATCC 14028 en estado planctónico y sétil. Los AE fueron suministrados y caracterizados por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de especies vegetales aromáticas y medicinales tropicales (CENIVAM). De los 15 AE, 4 presentaron actividad antimicrobiana y 6 propiedades anti-*biofilm*. El AE de *Lippia origanoides* quimiotipo carvacrol presentó la CMI más baja (0.37mg/mL) y CMB (0.75 mg/mL). Este AE también presentó el mayor porcentaje de inhibición del *biofilm* (>65%) sobre ambos microorganismos, lo cual pudo ser evidenciado en las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM). Además, el AE de LOC fue el único AE que presentó actividad anti-*quorum sensing* a concentraciones sub-inhedoras. Finalmente, los perfiles transcripcionales presentaron cambios significativos en la expresión de los genes relacionados con el *quorum sensing* y la formación del *biofilm*. Estos resultados indican que los aceites esenciales pueden inhibir tanto la expresión de los genes involucrados en el mecanismo de *quorum sensing* como el crecimiento de microorganismos formadores de *biofilm* y que tendrían un potencial uso como agente antimicrobiano.

*Trabajo de Grado

**Escuela de Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander.

Director: Rodrigo Torres Sáez, PhD. Codirector: Marlon Yesid Cáceres Ortíz, MSc.

Abstract

TITLE: APPLICATION OF ESSENTIAL OILS OF AROMATIC MEDICINAL PLANTS FOR THE INHIBITION OF *QUORUM SENSING* AND THE FORMATION OF *BIOFILM* IN *Salmonella enterica* serovar Enteritidis And *Salmonella enterica* serovar Typhimurium*

AUTHOR: YULIANY TORCOROMA GUILLÍN RINCÓN**

KEYWORDS: OILS ESSENTIAL, *BIOFILM*, *QUORUM SENSING*, *Salmonella*

DESCRIPCIÓN:

The emergence of multi-drug resistant microorganisms represents a global challenge, due to the shortage of new effective antimicrobial agents. Therefore, it is necessary to search for new compounds that allow the treatment of these pathogenic microorganisms; In this context, the essential oils (EO) of medicinal aromatic plants have generated promising results. In this study, the biological potential of 15 AE on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 in planktonic and sessile state were evaluated. The AE were supplied and characterized by the Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de especies vegetales aromáticas y medicinales tropicales (CENIVAM). Of the 15 AE, 4 presented antimicrobial activity and 6 anti-*biofilm* properties. The EO of *Lippia origanoides* chemotype carvacrol had the lowest MIC (0.37 mg / mL) and CMB (0.75 mg / mL). This AE also presented the highest percentage of *biofilm* inhibition (>65%) on both microorganisms, which could be evidenced in scanning electron microscopy (SEM) images. Also, the LOC AE was the only AE that presented anti-*quorum* sensing activity at sub-inhibitory concentrations. Finally, the transcriptional profiles showed significant changes in the expression of genes related to *quorum sensing* and *biofilm* formation. These results indicate that essential oils can inhibit both the expression of the genes involved in the *quorum sensing* mechanism and the growth of *biofilm*-forming microorganisms and that they would have potential use as an antimicrobial agent.

*Degree Project

**Escuela de Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander.

Director: Rodrigo Torres Sáez, PhD. Codirector: Marlon Yesid Cáceres Ortíz, MSc.

Introducción

La salmonelosis no tifoidea es una de las enfermedades zoonóticas más relevantes a nivel global debido al impacto que presenta sobre la salud humana y animal. Se estima que anualmente 93 millones de personas son infectadas por bacterias del género *Salmonella* y 155 mil mueren a causa de este patógeno (Quesada, Reginatto, Español, Colantonio, & Burrone, 2016). La principal causa de contagio es la ingestión de alimentos contaminados provenientes de animales, tales como carne, huevo y leche, al igual que la ingestión de frutas, verduras y agua contaminada (Gonzalez Pedraza, Sanandres, Varela, Aguirre, & Camacho, 2014). Estos microorganismos actúan como agentes etiológicos de infecciones intestinales y sistémicas, las afecciones más frecuentes son gastroenteritis, bacteriemia, estado portador crónico asintomático o infección localizada (Piatek, J., Sommermeyer, H., Bernatek, M., Ciechelska-Rybarczyk, A., Oleskow, B., Mikkelsen, L. S., & Barken, 2019).

Actualmente, organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) han informado nuevamente el incremento de resistencia a antibióticos en cepas de *Salmonella* sp, debido al uso indiscriminado de bactericidas (Akova, 2016; Rivera Calderon, Motta Delgado, Ceron Urbano, & Chimonja Coy, 2012). Por tanto, enfermedades que se encontraban controladas hace algunas décadas, ahora reinciden con microorganismos multirresistentes. La multiresistencia se adquiere mediante varios mecanismos, como propiedad intrínseca o adquirida (nuevo material genético, mutaciones en cromosomas bacterianos, activación de bombas, plásmidos o transposones, etc.) (Sharma, Johnson, Cizmas, McDonald, & Kim, 2016).

Además, los microorganismos del género *Salmonella* tienen la capacidad de formar *biofilms*, mediante diferentes tipos de comunicación celular química (p.ej: *quorum sensing*), característica asociada a muchas infecciones intrahospitalarias persistentes, especialmente en la población inmunocomprometida. El *biofilm* le confiere a los microorganismos un aumento en la capacidad de resistencia, por tanto, los antibióticos no pueden ejercer su función bactericida y el control sobre los microorganismos resulta más complejo (Meneses ML, 2011; Vestby, Møretø, Langsrud, Heir, & Nesse, 2009).

La farmacorresistencia del *biofilm* se ha atribuido a varios factores: (i) sustancias poliméricas extracelulares (EPS), las cuales actúa como barrera física y química; (ii) metabolismo celular disminuido, lo que impide que los antibióticos que actúan sobre células en división no presenten ningún efecto significativo; (iii) el ADN extracelular posee carga negativa lo que permite la unión a los antibióticos con carga positiva, disminuyendo su concentración efectiva, entre otros (Olsen, 2015; S. Singh & , Santosh Kumar Singh, 2017).

Por esta razón, se hace indispensable la búsqueda de nuevas alternativas que permitan la erradicación de microorganismos patógenos resistentes; en este contexto, los productos naturales han generado resultados prometedores en las últimas décadas, principalmente los aceites esenciales (AE), los cuales presentan en general actividad biológica y podrían tener un potencial terapéutico importante debido a su alto contenido de compuestos químicos como aldehídos, fenoles y terpenos (Ammar et al., 2016; Swamy et al., 2016; Yang et al., 2015). Esta característica permite un amplio espectro de acción sobre distintos microorganismos, así como también múltiples

propiedades, como inhibición del *quorum sensing*, prevención de la formación de *biofilms*, e inhibición del crecimiento de los microorganismos resistentes (Savoia, 2012; Sepahi, Tarighi, Ahmadi, & Bagheri, 2015).

Este trabajo tuvo como objetivo principal determinar los efectos de los compuestos fitoquímicos de aceites esenciales sobre el crecimiento de microorganismos patógenos, su capacidad de inhibición de *quorum sensing*, inhibición de la formación del *biofilm* y posible toxicidad para validar su aplicación como potencial agente antibacteriano. Para ello, se requirió estudiar las principales vías implicadas en la comunicación celular bacteriana (QS) y por ende la formación del *biofilm* en microorganismos patógenos del género *Salmonella* mediante el uso de técnicas transcriptómicas, con el fin de comprender la sensibilidad que presentan los microorganismos a compuestos antibacterianos derivadas de plantas aromáticas, y evitar que los microorganismos generen nuevamente resistencia frente a moléculas de este tipo.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar la actividad biológica de aceites esenciales medicinales mediante el estudio de la inhibición de *quorum sensing* y formación de *biofilm* de bacterias patógenas.

1.2 Objetivos específicos

- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de diferentes aceites esenciales de plantas aromáticas en cultivos planctónicos de diferentes bacterias patógenas del género *Salmonella*.
- Estudiar la inhibición de formación de *biofilm* de *Salmonella* tratadas con aceites esenciales de plantas aromáticas.
- Determinar la actividad citotóxica *in vitro* de diferentes aceites esenciales con actividad antimicrobiana en células eucariotas.
- Correlacionar la inhibición de *quorum sensing* de los diferentes tipos de aceites esenciales de plantas con la expresión de los genes involucrados en el *quorum sensing* y formación de *biofilm*.

2. Marco teórico

2.1 *Salmonella* sp

Salmonella enterica es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Las infecciones causadas por *Salmonella* generan un grave problema de salud pública, al ser uno de los principales microorganismos transmitidos por los alimentos y generar cientos de muertes cada año (Organización Mundial de la Salud, 2017b). *S. enterica* serovariedad Enteritidis es uno de los serotipos más comunes responsable de gastroenteritis junto con *S. enterica* serovariedad Typhimurium, siendo causa de un gran número de enfermedades humanas, a pesar de la implementación continua de medidas de control y prevención (Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, 2012). La supervivencia de los diferentes serotipos de *Salmonella* en diferentes ambientes depende, entre otras, del pH, la temperatura, el sistema inmune del hospedero y su respuesta a diferentes serotipos, la presencia de organismos comensales, el genotipo de la bacteria, la capacidad de formación de *biofilm*, y la virulencia (Dong et al., 2011; Foley, Johnson, Ricke, Nayak, & Danzeisen, 2013).

Las características generales de la formación de *biofilm* también se aplican al patógeno entérico *Salmonella*, el cual sigue un estilo de vida cíclico en el que la colonización del huésped se alterna con períodos de supervivencia fuera del huésped (Winfield & Groisman, 2003). Se ha demostrado en diferentes estudios la capacidad de las cepas de *Salmonella* para formar *biofilm* sobre superficies abióticas fuera del huésped, entre las que se cuentan materiales como el plástico, caucho, cemento, vidrio y acero inoxidable (Arnold & Yates, 2009; Mireles, Toguchi, & Harshey, 2001; Prouty & Gunn, 2003; Stepanović et al., 2004)

Debido a que los *biofilms* formados por *Salmonella* son más resistentes a factores de estrés ambiental tales como la desecación y los desinfectantes, la capacidad de *Salmonella* para formar *biofilms* en estas superficies, probablemente contribuya a la supervivencia fuera del huésped y a la transmisión hacia nuevos huéspedes (Vestby et al., 2009). Además, *Salmonella* puede colonizar a diferentes vegetales, de tal manera que éstas plantas actúan como vectores para la transmisión de los microorganismos en el huésped; en este contexto, se ha demostrado que la contaminación del suelo por parte de *S. entérica* puede conducir a la contaminación de una variedad de cultivos agrícolas como tomate, lechuga, perejil, rábano y zanahoria (Barak & Liang, 2008; Islam et al., 2004).

Salmonella también presenta la capacidad de adherirse y posteriormente formar comunidades bacterianas, microcolonias e incluso *biofilms* maduros en células epiteliales, lo cual presenta un papel relevante en el establecimiento y persistencia de infecciones en las mucosas e intestinos de los huéspedes (Althouse, Patterson, Fedorka-Cray, & Isaacson, 2003; Ricke, 2003).

El papel del QS en la regulación de la formación de *biofilms* de *Salmonella* se basa en tres sistemas de percepción de quórum: Acil homoserina lactona (AHL), autoinductor-2 (AI-2) y autoinductor-3 (AI-3). En primer lugar *Salmonella* codifica un factor de transcripción de la familia LuxR, llamado *SdiA*, el cual responde a la AHL producida por otros microorganismos (Ahmer, 2004). Hasta la fecha, *SdiA* es conocida por activar la expresión del operón *rck* y del gen *srgE*; la expresión de *rck* ha demostrado promover la adherencia de células epiteliales y proteínas de la matriz extracelular, cuya función es proporcionar resistencia al *biofilm* (Smith et al., 2008).

El segundo sistema de QS de *Salmonella* utiliza la enzima LuxS para la síntesis de AI-2; se ha documentado que la formación del *biofilm* se ve afectado si existe una mutación en el gen que codifica para la enzima LuxS (Smith & Ahmer, 2003) el tercer mecanismo de QS utiliza los dos componentes del sistema preA/B, este sistema es homólogo y funcionalmente intercambiable al presente en *E.coli* denominado QseB/C (De Keersmaeckert et al., 2005). Estos sistemas inducen la formación de AI-3, así como de las hormonas adrenalina y epinefrina (Merighi et al., 2006)

Por otra parte, se ha demostrado en diversos estudios la resistencia de *Salmonella* frente a los antibióticos; se ha comparado el efecto de la enrofloxacina, gentamicina, eritromicina, tilmicosina, ampicilina, oxitetraciclina y trimetoprim-sulfadoxina en células planctónicas y células agrupadas en *biofilms*. Los resultados demostraron que las células planctónicas fueron sensibles a concentraciones menores de 20 µg/mL, excepto para antibióticos como eritromicina y tilmicosina; mientras que los biofilms de *Salmonella* sólo fueron sensibles a enrofloxacina (Olson et al., 2002; Tabak et al., 2009).

2.2 Formación de *biofilm* y *quorum sensing*

La necesidad de enfoques alternativos para luchar contra cepas bacterianas resistentes se deriva del hecho que 16 millones de personas mueren anualmente a causa de enfermedades infecciosas. Cabe destacar que más del 80% de las infecciones bacterianas en seres humanos involucran la formación de biopelículas, una de las áreas en las que el comportamiento bacteriano puede estar mediado por QS, ocasionando un impacto relevante en el deterioro de alimentos, la acuicultura, la purificación del agua, entre otros (Skandamis & Nychas, 2012).

El *biofilm* es una comunidad microbiana compuesta de células sésiles irreversiblemente unidas a un sustrato o a una interfaz incrustada en una matriz de polímero extracelular producido por sustancias sintetizadas por los propios microorganismos y que presentan una modificación del fenotipo en relación con la velocidad de crecimiento y la transcripción de genes (Burmølle et al., 2010). De acuerdo con estudios recientes, la formación del *biofilm* es el producto de un sistema de comunicación o señalización célula-célula denominado *quorum sensing* (QS), el cual actúa como un auténtico lenguaje a través de señales químicas. Este sistema funciona a modo de “acuerdo” (*quorum*), entre las células bacterianas, para la activación o represión de genes específicos (entre ellos los que regulan la producción de *biofilm*), mediante la liberación y la detección de ciertas sustancias llamadas “autoinductores”. La regulación de los genes (QS) durante el crecimiento del *biofilm* se debe a la acumulación de moléculas señal y se define como la asociación bacteriana dependiente de la comunicación intercelular (Skandamis & Nychas, 2012). Los mecanismos moleculares y los factores que participan en este control están aún por dilucidar, aunque ya se conoce el operón que interviene en la creación de este sistema (de Kievit, Iglewski, Kievit, & Teresa, 2000; Galloway, Hodgkinson, Bowden, Welch, & Spring, 2011; Olivero-Verbel, Barreto-Maya, Bertel-Sevilla, & Stashenko, 2014).

Las células del *biofilm* están embebidas en una matriz compuesta por polímero extracelular, la densidad celular de una biopelícula se encuentra entre 10^4 células/cm² – 10^8 células/cm², siendo éstos los valores que marcan la diferencia entre una biopelícula visible y una invisible. Los *biofilms* microbianos influyen en casi todos los aspectos de nuestras vidas, siendo relevantes en prácticas médicas, ecológicas, biotecnológicas e inclusive económicas (Burmølle et al., 2010; Joo & Otto, 2012).

Los sistemas QS son ubicuos en las bacterias, y regulan diversas funciones celulares, entre las cuales se incluyen la formación de *biofilms*, luminiscencia, producción de antibióticos, factores de expresión de virulencia, producción de pigmentos y motilidad (Galloway et al., 2011; Whitehead, 2001). El QS es un mecanismo de comunicación celular que permite a las bacterias reconocer y controlar la densidad de la población bacteriana, midiendo la acumulación de una molécula de señalización específica conocida como autoinductores (Mukherjee, Moustafa, Smith, Goldberg, & Bassler, 2017). Estas moléculas son producidas a niveles basales y su concentración aumenta de manera directamente proporcional con la concentración bacteriana, debido a que las señales pueden difundirse a través de la membrana, su concentración dentro de las células se aproxima a la concentración en el medio ambiente. Al alcanzar una concentración umbral, las moléculas señal pueden activar los receptores de las células bacterianas (Antunes et al., 2010). En algunos microorganismos, estas señales químicas son importantes para el establecimiento de la infección y se han relacionado con el cambio de la infección a un estado patológico (Holm & Vikström, 2014; Sircili, Walters, Trabulsi, & Sperandio, 2004).

2.3 Compuestos de plantas medicinales como antimicrobianos

Las plantas producen una gran diversidad de metabolitos secundarios con una función biológica de protección contra predadores y patógenos microbianos. Algunos de estos metabolitos están también involucrados en mecanismos de defensa contra estrés abiótico (por ej. Exposición a UV-B) y son importantes en la interacción de las plantas con otros organismos (ej. Atracción de polinizadores) (Seow, Yeo, Chung, & Yuk, 2014). Se estima que alrededor de 100 mil metabolitos secundarios podrían ser encontrados en las plantas, y que la mayoría de ellos participan en sistemas

de defensa química. No obstante, pareciera ser que han aparecido como una respuesta de las plantas a interacciones con predadores a través de millones de años de co-evolución (Bennett & Wallsgrave, 1994; Moore, Andrew, Külheim, & Foley, 2014; Sepúlveda-jiménez, 2003).

Entre los compuestos sintetizados por las plantas se destacan los aceites esenciales (AE), los cuales son mezclas complejas de constituyentes volátiles con dos grupos biosintéticamente relacionados (Millezi, Caixeta, Rossoni, Cardoso, & Piccoli, 2012). Estos grupos principales incluyen terpenos y terpenoides, y compuestos aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por tener un bajo peso molecular. La actividad antimicrobiana de los AE se encuentra mayoritariamente en terpenoides oxidados (ej. Alcoholes y terpenos fenólicos), aunque otros compuestos también tienen efectos antimicrobianos como los producidos por algunas algas (furanonas halógenas) (Bauer & Robinson, 2002; Gonzalez & Keshavan, 2006; Skrinjar & Nemet, 2009). Por otro lado, las interacciones entre estos componentes pueden llevar a efectos antagonistas, aditivos o sinérgicos. Algunos estudios han demostrado que los AE totales tienen usualmente actividad antibacteriana más alta que las mezclas de sus componentes mayoritarios, sugiriendo que los componentes minoritarios son críticos para la actividad sinérgica (Bączek et al., 2017; Stefanakis et al., 2013; Yagi, Babiker, Tzanova, & Schohn, 2016).

2. Materiales y métodos

3.1 Material vegetal y extracción

Los aceites esenciales empleados en este estudio fueron caracterizados y suministrados por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales tropicales (CENIVAM). El material vegetal fue colectado en cultivos

experimentales ubicados en el complejo Agroindustrial Piloto del CENIVAM (N 07°08,442; WO 73°06,960; 977 msnm) y los especímenes fueron depositados en el Herbario Nacional Colombiano (COL).

Los aceites esenciales fueron obtenidos mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas en un equipo tipo Clevenger. El aceite esencial obtenido se secó con sulfato de sodio anhidro, se pesó y se almacenó a una temperatura de 4 °C. Todas las extracciones se hicieron por triplicado.

Las muestras se analizaron en un equipo *Agilent Technologies 6890N Series Network System* (Palo Alto, California, EE. UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975 Inert XL*. Se utilizaron una columna capilar apolar, DB-5MS, de 60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 μm (d_f), con fase estacionaria de 5%-fenil-poli (dimetilsiloxano), y una columna capilar polar, DB-WAX, de 60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 μm (d_f), con fase estacionaria de poli (etilenglicol). Se utilizó helio como gas de arrastre (99.995% gas AP, Linde, Bucaramanga, Colombia), con un flujo volumétrico constante de 1 mL/min. La temperatura del horno se programó de 45 °C (5 min) hasta 150 °C (3 min) a 3 °C/min, luego, hasta 220 °C (5 min), a 4 °C/min.

Cuando se utilizó la columna apolar, se agregó una etapa de calentamiento final a 10°C min⁻¹ hasta 275 °C (15 min). La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C, se usó la relación *split* 1:30. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI) con energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia permanecieron a 230 y 285 °C, respectivamente. Los espectros de masas, corrientes iónicas totales (TIC) y del ion extraído (EIC) se obtuvieron con un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*) en el rango de masas de m/z 40-350 (5,5 espectros/s). Los componentes

de los aceites esenciales se identificaron por comparación de sus espectros de masas, obtenidos por GC-MS, e índices de retención lineales (LRI) en las dos columnas, polar y apolar, calculados con base en la serie homóloga de *n*-alcanos C₉-C₂₅ (Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.) y comparados con los de diferentes bases de espectros de masas (NIST, 2014 y Wiley, 2008) y datos de literatura científica.

Para la identificación confirmatoria de los componentes de los aceites esenciales, extractos o fracciones volátiles, se usaron las siguientes sustancias-patrón, adquiridas a Sigma-Aldrich (Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.): Acetato de geranilo (98%), aromadendreno (97%), benzoato de bencilo, β-cariofileno (98,5%), 1,8-cineol (99%), p-cimeno (99%), α-copaeno (90%), trans, trans-farnesol (96%), geraniol (98%), hexanal (98%), α-humuleno (96%), linalool (97%), (R)-(+)-limoneno (97%), mentol (99%), (+)-mentona (98,5%), *trans*-nerolidol (85%), óxido de cariofileno (95%), α-pineno (98%). Todos los solventes empleados fueron de grado HPLC.

3.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Los microorganismos usados para este estudio fueron *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076, los cuales fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA) y *Chromobacterium violaceum* CV026, adquirido del cepario de la Universidad de Santander. Antes de llevar a cabo los experimentos, las bacterias fueron inoculadas en los siguientes caldos de cultivo, *Salmonella* en medio M63 a 37 °C y *C. violaceum* en Caldo Luria Bertani (LB) a 26 °C (O'Toole, 2011).

3.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales *in vitro* sobre células planctónicas

El efecto antimicrobiano de 15 aceites esenciales fue determinado mediante el método de microdilución en caldo (CLSI, 2015). La evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) se realizó de acuerdo con el protocolo descrito y estandarizado en el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología (Paredes, Ortiz, & Torres, 2014).

Para esto, se preparó un preinóculo de cada una de las bacterias en medio M63 cultivado durante 12 horas a 37 °C y a 200 rpm. El preinóculo fue diluido en medio de cultivo hasta alcanzar una concentración bacteriana de 10^5 - 10^6 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) para posteriormente ser usado en los estudios de efecto de aceites esenciales sobre los cultivos bacterianos. Seguidamente, se sembró 100 µL de cultivo bacteriano y 100 µL de AE disueltos en Dimetil sulfóxido (DMSO, 100%) a diferentes concentraciones (1.5 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.37 mg/mL, y 0.18 mg/mL), el porcentaje de DMSO en las concentraciones probadas de los AE fue menor al 1%. Las microplacas se incubaron a 37 °C con agitación constante (200rpm) y se realizaron medidas del crecimiento microbiando en un espectrofotómetro lector de microplaca ELISA (Biorad, imarck) a 595 nm cada hora durante 24 h. La CMI se definió como la menor concentración del AE a la cual se produce una inhibición en el crecimiento de la bacteria. Los valores de CMI corresponderán a las dosis que inhiban el crecimiento microbiano.

Posterior a la cinética de crecimiento, se tomó una alícuota de 100µL de cada pozo que contenían diferentes concentraciones de AE y se incubó en 900µL de medio de infusión cerebro corazón (BHI) en tubos eppendorf a 37°C durante 24 horas. Luego se tomó una alícuota de 10µL y se transfirió a placas de agar BHI con el fin de confirmar el efecto bactericida. El valor de la

CMB se determinó como la concentración donde el 100% del crecimiento bacteriano se inhibe completamente en comparación con el control positivo de crecimiento de los microorganismos (sin tratamiento con los AE). Como control positivo de inhibición microbiana se utilizó el antibiótico Ofloxacin.

3.4 Inhibición de Formación de *biofilm in vitro*

Se llevó a cabo de acuerdo con el método desarrollado por Molhoek *et al.*, (2011), con algunas modificaciones. La formación del *biofilm* se realizó en microplacas de 96 pozos de poliestireno de fondo redondo. Para esto, se agregó 100 μL de un cultivo bacteriano overnight diluido 1:10 en medio fresco M63 a una microplaca que contenía 100 μL de AE a diferentes concentraciones. Las microplacas fueron incubadas a 37° C por 24 h sin agitación.

Posteriormente, la biomasa del *biofilm* fue cuantificada mediante el método de tinción con cristal violeta. La microplaca fue lavada tres veces con buffer fosfato 1mM pH 7 con el fin de remover las células planctónicas. Luego, 200 μL de cristal violeta al 0.4% (p/v) fueron adicionados a cada uno de los pozos durante 15 min. El exceso de cristal violeta fue eliminado realizando tres lavados consecutivos con buffer fosfato 1mM pH 7 y se agregaron 200 μL de ácido acético al 30% para remover el colorante adherido. El contenido de cada pozo fue transferido a una nueva microplaca de fondo plano para cuantificar la absorbancia a 595 nm en un lector de microplaca ELISA (Biorad, imarck) (O'Toole, 2011).

3.5 Inhibición de *quorum sensing* por aceites esenciales

Este ensayo se llevó a cabo midiendo la formación del pigmento violaceina, producido por la bacteria *C. violaceum* CV026 como resultado de su actividad de *QS* (B. N. Singh et al., 2009).

Antes de realizar las pruebas de inhibición de la producción de violaceína se determinó la CMI de los AE sobre el biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026 mediante el método de microdilución en caldo.

Para el ensayo de inhibición de la producción de violaceína, se adicionaron 150 μ L de AE a concentraciones finales sub-inhedoras a 3 mL de medio LB que contenía 150 μ L de Bacteria CV026 (16 h ajustado a 2×10^8 UFC/mL en medio LB suplementado con 10 μ L de Kanamicina 50 mg/mL) y 15 μ L de Acil homoserina lactona C6-HSL, los cuales fueron incubados a 25 °C durante 24 h con agitación (200 rpm). Seguidamente se realizó la extracción del pigmento violaceína de acuerdo al método descrito por (Choo, Rukayadi, & Hwang, 2006). Se tomó 1 mL del cultivo microbiano y se centrifugó durante 5 min a 13000 g y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 500 μ L DMSO. Luego se aplicó vortex para disolver la violaceína y se volvió a centrifugar durante 5 min a 13000 g. El sobrenadante fue transferido a una microplaca de 96 pozos, y la absorbancia fue cuantificada a 595 nm en un lector de microplacas ELISA (Biorad, imarck).

3.6 Evaluación de la citotoxicidad de los aceites esenciales usando modelos de líneas eucariotas

La capacidad citotóxica de los AE se evaluó midiendo la viabilidad celular a través del método colorimétrico de MTT (sal de bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol -2 il)- 2,5- difenil tetrazolio) descrito por Mosmann (Mosmann, 1983). En este método las células viables y metabólicamente activas reducen la sal de tetrazolio (amarilla) formando cristales de formazan (violeta) solubles en DMSO que pueden ser cuantificados a 550 nm.

Las células Vero (riñón de mono verde africano, ATCC N° CCL-81) fueron cultivadas en Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% (p/v) en placas de 96 pozos (1×10^4 células/pozo), las cuales luego se incubaron a 37°C con atmósfera de

CO₂ (5% (v/v)) durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de AE disueltos en DMSO (en el rango 1.5 mg/mL a 0.37 mg/mL) manteniendo una concentración máxima de 0,1% (v/v) de DMSO. Después de transcurrido el tiempo de tratamiento (48 horas), se descartó el sobrenadante de los pozos, y se adicionaron 200 µL de MTT (500 µg/mL en solución salina de Hanks, HBSS). Luego, de que las células fueron incubadas durante 3 horas. La solución de MTT fue retirada y se agregaron 200 µL de DMSO a cada pozo para solubilizar los cristales formados. La absorbancia del formazan fue medida a 550 nm en un lector de microplacas MultiSkan Go-Thermo. Finalmente, se calculó el índice de selectividad (SI) definido como la relación que existe entre toxicidad e inhibición de crecimiento microbiano ($SI=IC_{50}/CMI$). La viabilidad de las células cultivadas sin AE fue considerada como 100% (Hajlaoui, Hedi, Aouni, & Gharsallah, 2018).

3.7 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para visualizar el efecto del aceite esencial sobre *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium se realizó un análisis por microscopia electrónica de barrido (SEM). Se preparó un preinóculo de cada una de las bacterias cultivándolas en medio M63 durante 12 horas a 37 °C y agitación orbital de 200 rpm. Luego, se agregó 1 mL del inóculo bacteriano 10^5 - 10^6 UFC/mL a un biorreactor escalado con un volumen de 10mL, en batch, con burbujeo de aire, el cual contenía cupones de vidrio esmerilado de 2x5 cm, medio de cultivo M63 y la concentración subinhibitoria del aceite esencial incubado durante 24 h. Al cabo de 24 h los cupones fueron lavados tres veces con buffer fosfato 0.1 mM pH 7 para eliminar las células planctónicas. Seguidamente se realizó el proceso de fijación con glutaraldehído al 2,5% (v/v) por 60 min y la deshidratación con un gradiente de isopropanol (10-95% (v/v)) por 10 min (Fischer, Hansen, Nair, Hoyt, & Dorward,

2013). Finalmente, los cupones fueron observados en un microscopio electrónico Quanta 650 FEG (FEI), el cual está equipado con un detector de imágenes Everhart Thornley detector ETD.

3.8 Análisis de la expresión de genes involucrados en *quorum sensing* y en la formación del *biofilm*

Los ensayos para la formación e inhibición del *biofilm* fueron realizados en un biorreactor escalado con un volumen total de 40 mL, cultivando las células en modo batch, con burbujeo de aire y cupones de 2x15 cm de vidrio esmerilado. Posteriormente, se agregó un inóculo de $\sim 10^8$ UFC/mL de cada una de las bacterias por separado en los biorreactores que contenían los cupones para la formación del *biofilm*, el medio de cultivo M63 y el aceite esencial seleccionado a concentraciones sub-inhedoras. A continuación se incubaron durante 24 h para luego recuperarse las células planctónicas, y mediante espátulas estériles remover las células sésiles para realizar la extracción de ARN. Adicionalmente, se incluyó un control de células en estado planctónico y *biofilm* no tratadas con el aceite esencial. Los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado.

3.9 Extracción de ARN y análisis transcripcional

El efecto de los AE sobre la expresión de los genes relacionados con el *quorum sensing* y la formación del *biofilm* fue analizado mediante RT-qPCR. Para esto, se realizó la extracción de RNA total mediante el kit “PureLink RNA Mini Kit” (Invitrogen) según lo indicado por el fabricante. Posteriormente, se evaluó la purificación del ARN en un equipo IMPLEN NanoPhotometer NP80 y se realizó la copia a cDNA con el kit “Revert Aid™ H minus first strand cDNA synthesis kit” (Fermentas; Thermo Fisher Scientific).

La q-PCR se llevó a cabo en un equipo PCR de tiempo real con el kit Luna Universal qPCR Master mix (New England Biolabs, Ipswich, Ma, USA) para la detección de las copias de cDNA.

Para evaluar el efecto de los aceites esenciales sobre la expresión génica, se usaron como biomarcadores los genes implicados en la comunicación celular química, el primero corresponde al Acil homoserina lactona (AHL), el cual utiliza la transcripción de *LuxR* (*SdiA*), por otra parte el segundo autoinductor (Ai-2) está determinado por la enzima *LuxS* y el tercer Autoinductor (AI-3) por el componente del sistema *QseB*. Como genes housekeeping para la normalización se usaron los genes *gst* (glutación transferasa) y *gnd* (6-fosfogluconato deshidrogenasa). Los niveles de transcriptos fueron normalizados a la expresión del gen *gst*, puesto que la expresión de éste se ha encontrado que es el más estable bajo tratamientos con inhibidores de QS. Los cambios relativos en la expresión génica y eficiencia fueron calculados usando la metodología descrita por Livak, K. J., & Schmittgen, T. D, 2001 (Livak & Schmittgen, 2001).

4.0 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como medias \pm desviaciones estándar para cada uno de los ensayos. Para verificar la normalidad de los datos se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y una prueba de F máxima para probar la homogeneidad de varianza. Se realizó una ANOVA para determinar el significado de las diferencias. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en la plataforma R (R Core Team, 2018) considerando una $p < 0.05$. Los cambios significativos se indican mediante asteriscos en las figuras.

4. Resultados

4.1 Material vegetal y extracción

La caracterización de los aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) de *Lippia alba* carvona (LACA), *Lippia alba* citral (LACI), *Cymbopogon nardus* (CN), *Cymbopogon martini* (CM), *Cymbopogon flexuosus* (CF), *Lippia origanoides* timol

(LOT), *Lippia origanoides* carvacrol (LOC), *Lippia origanoides* felandreno (LOF), *Rosmarinus officinalis* (RO), *Salvia officinalis* (SO), *Swinglea glutinosa* (SG), *Tagetes lucida* (TL), *Thymus vulgaris* (TV), *Satureja viminea* (SV), y *Cananga odorata* (CO) permitió la identificación de 40 compuestos diferentes (Tabla 1). Al analizar la abundancia de los compuestos individualmente se encontró que el constituyente mayoritario en 9 de los 15 aceites esenciales fueron los Monoterpenos Oxigenados (MO) con el 35% del total de los compuestos identificados, seguido de los Compuestos Oxigenados (CO, 27,5%), Hidrocarburos Monoterpenicos (MH, 22.5%), Hidrocarburos Sesquiterpénicos (SH, 12.5%) y Sesquiterpenos Oxigenados (SO 2.5%).

Las especies del género *Lippia* presentaron diferencias entre los compuestos mayoritarios caracterizados en este estudio. Para el caso de *Lippia alba* carvona y *Lippia alba* citral predominan los MO como la carvona (31.3%) y el geranial (27%) respectivamente. Mientras que *Lippia origanoides* quimiotipo carvacrol y timol predominan los CO como el timol 32.7% y 22.1% y el carvacrol 18.8% y 10.7%, respectivamente. En *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno los SH fueron los compuestos más abundantes.

Los componentes encontrados en mayor proporción en el género *Cymbopogon*, fueron los MO, siendo el geraniol el componente mayoritario en *Cymbopogon nardus* (17.8%) y *Cymbopogon martini* (38.7%), además fue el MO presente en las tres especies de este género. Para el caso de *Cymbopogon flexuosus* el geranial (33%) fue el componente en mayor proporción. Los MO también fueron los componentes mayoritarios en otras especies vegetales como: *Rosmarinus officinalis*, *Swinglea glutinosa*, *Salvia officinalis* y *Tagetes lucida*. El compuesto 1,8-cineol fue más abundante en las dos primeras especies (RO) 17.5% y (SG) 36.6%. En la especie *Salvia*

officinalis el MO más abundante fue *trans*-tujona (20.4%) y en *Tagetes lucida* con más del 50%, el estragol (79.9%).

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* se caracterizó por presentar un alto contenido MH, siendo el p-cimeno el compuesto en mayor proporción (20.4%). Por otro lado, en las especies *Satureja viminea* y *Cananga odorata* los CO fueron los componentes más abundantes. En el caso de SV el 1-Isopropenil-4-metil-1-ciclohexano (24.4%) y en CO el bezoato de bencilo (20.8%).

Tabla 1. Composición química (%) de los aceites esenciales.

Aceite esencial		Compuestos mayoritarios (%)
Código	Planta	
LACA	<i>Lippia</i>	Limoneno ^a (29), β -bourboneno ^d (2.4), germacreno D ^d
	<i>alba</i> (carvona)	(12.2), carvona ^b (31.3), piperitenona ^b (1.5).
LACI	<i>Lippia</i>	Limoneno ^a (3.9), <i>trans</i> - β -cariofileno ^d (11.8), neral ^b
	<i>alba</i> (citral)	(15.4), geranial ^b (27), geraniol ^b (6.1).
CN	<i>Cymbopogon</i>	Citronelal ^b (11.6), 2,6-dimetil-2,6-octadieno ^c (6.1),
	<i>nardus</i>	citronelol ^b (16.9), geraniol ^b (17.8).
CM	<i>Cymbopogon</i>	<i>trans</i> - β -Ocimeno ^a (1.9), linalol ^b (3.2), acetato de
	<i>martini</i>	geranilo ^c (1.3), geraniol ^b (38.7).
CF	<i>Cymbopogon</i>	Neral ^b (24.5), geranial ^b (33), geraniol ^b (7.9) y acetato
	<i>flexuosos</i>	de geranilo ^c (0.5).

LOT	<i>Lippia origanoides</i> (timol)	<i>p</i> -Cimeno ^a (3.7), timol metil éter ^c (4.6), <i>trans</i> - β -cariofileno ^d (7.9), timol ^c (22.1), carvacrol ^c (10.7), acetato de timilo ^c (3.9).
LOC	<i>Lippia origanoides</i> (carvacrol)	γ -Terpineno ^a (5.2), <i>p</i> -cimeno ^a (1.1), timol ^c (32.7), carvacrol ^c (18.8), <i>trans</i> - β -cariofileno ^d (6.4).
LOF	<i>Lippia origanoides</i> (felandreno)	α -Felandrenos ^a (5.7), 1,8-cineol ^b (11.6), <i>p</i> -cimeno ^a (5.7), <i>trans</i> - β -cariofileno ^d (10.4), α -humuleno ^d (6.2)
RO	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -Pinenos ^a (12.7), canfeno ^a (7.7), 1, 8-cineol ^b (17.5), alcanfor ^b (14.8), <i>trans</i> - β -cariofileno ^d (7.8).
SO	<i>Salvia officinalis</i>	1,8-Cineol ^b (5.3), <i>trans</i> -tujona ^b (20.4), <i>cis</i> -tujona ^b (5.8), alcanfor ^b (8.5), α -humuleno ^d (9.8).
SG	<i>Swinglea glutinosa</i>	α -Pinenos ^a (2.6), <i>trans</i> - β -cariofileno (36.6) germacreno D ^d (15.4), germacreno B ^d (10.8), <i>trans</i> nerolidol ^c (24.0).
TL	<i>Tagetes lucida</i>	Estragol ^b (79.9), β -mirceno ^a (0.9).
TV	<i>Thymus vulgaris</i>	γ -Terpineno ^a (9.5), <i>p</i> -cimeno ^a (20), linalol ^b (4.7), <i>trans</i> - β -cariofileno ^d (9.5), timol ^c (23).
SV	<i>Satureja viminea</i>	1-Isopropenil-4-metil-1-ciclohexano ^c (24.4%), <i>trans</i> - β -cariofileno ^d (11.8), pulegona ^b (11.1), <i>cis</i> -pulegol (7.1%).

CO	<i>Cananga</i>	Linalol ^b (11.7), benzoato de metilo ^c (3.7), acetato de
	<i>odorata</i>	bencilo ^c (10.3), cis-acetato de cinamilo ^c (5.4), benzoato de bencilo ^c (20.8).

Hidrocarburos monoterpénicos (MH)^a, Monoterpenos oxigenados (MO)^b, Compuestos oxigenados (CO)^c, Hidrocarburos sesquiterpénicos (SH)^d, Sesquiterpenos oxigenados (SO)^e.

4.2 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales *in vitro* sobre células planctónicas

La actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales sobre *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076 y *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium ATCC 14028 se realizó por el método de microdilución en caldo. Los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) se presentan en la Tabla 2.

De los 15 AE evaluados, 4 AE (*Cymbopogon martini*, *Lippia origanoides* timol, *Lippia origanoides* carvacrol y *Thymus vulgaris*) presentaron actividad inhibitoria frente a las cepas bacterianas en estudio. Los valores de CMI se encuentran en un rango de 0.75 mg/mL y 0.37 mg/mL y los de CMB entre 1.5 mg/mL y 0.75 mg/mL. El AE con mayor inhibición bacteriana para ambos microorganismos fue LOC, (CMI 0.37 mg/mL y CMB 0.75 mg/mL) el cual se caracterizó por presentar el mayor contenido de timol y carvacrol (Tabla 1). Seguidamente, el AE de LOT presentó una actividad antimicrobiana similar al AE de LOC sobre *Salmonella* Enteritidis (CMI 0.37 mg/mL y CMB 0.75), sin embargo, la CMI y la CMB aumentó en *Salmonella*

Typhimurium (CMI 0.75 mg/mL y CMB 1.5). Los AE de TV y CM presentaron un CMI 0.75 mg/mL y una CMB 1.5 mg/mL para ambos microorganismos.

En cuanto a su composición química, los AE de LOC, LOT y TV se caracterizaron por presentar un alto contenido de compuestos oxigenados (fenólicos) como el timol (compuesto de mayor proporción en los tres AE) y el carvacrol, además de presentar monoterpenos oxigenados como el p-cimeno e hidrocarburos sesquiterpénicos como el *trans*- β -cariofileno. Mientras que el AE de CM presentó un alto contenido de Monoterpenos oxigenados como el geraniol y el linalol. La actividad de los compuestos mencionados se ha atribuido principalmente a interacción con la bicapa lipídica de las membranas citoplasmáticas, lo cual interfiere en la pérdida de la integridad y la fuga de material celular como ADN, ATP o iones (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001).

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los 15 AE frente a *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* ATCC 13076. Los valores están expresados en mg/mL y cada experimento fue llevado a cabo por triplicado.

Aceites esenciales		<i>S. Typhimurium</i>		<i>S. Enteritidis</i>	
		ATCC 14028		ATCC 13076	
		CMI	CMB	CMI	CMB
Código	Especie	mg/mL			
LACA	<i>Lippia alba</i> (carvona)	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
LACI	<i>Lippia alba</i> (citral)	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
CN	<i>Cymbopogon nardus</i>	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
CM	<i>Cymbopogon martini</i>	0.75	1.5	0.75	1.5
CF	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5

LOT	<i>Lippia origanoides</i> Timol	0.75	1.5	0.37	0.75
LOC	<i>Lippia origanoides</i> Carvacrol	0.37	0.75	0.37	0.75
LOF	<i>Lippia origanoides</i> Felandreno	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
RO	<i>Rosmarinus officinalis</i>	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
SO	<i>Salvia officinalis</i>	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
SG	<i>Swinglea glutinosa</i>	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
TL	<i>Tagetes lucida</i>	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
TV	<i>Thymus vulgaris</i>	0.75	1.5	0.75	1.5
SV	<i>Satureja viminea</i>	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
CO	<i>Cananga odorata</i>	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5

4.3 Inhibición de Formación de *biofilm in vitro*

La actividad anti-*biofilm* de los 15 AE sobre *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *S. Typhimurium* ATCC 14028 fue evaluada mediante el método de tinción con cristal violeta. Las concentraciones de los AE evaluados dependieron de la actividad del AE frente a las células planctónicas, por lo tanto, los AE que presentaron actividad antimicrobiana fueron evaluados a concentraciones sub-inhedoras. Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición (Tabla 3).

Los AE de LOT, LOC y TV presentaron la CMI más baja con un porcentaje de inhibición de la formación del *biofilm* mayor al 60% frente a los microorganismos evaluados (Figura 1). En este caso, la inhibición del *biofilm* por acción de compuestos oxigenados, se atribuye a su capacidad para difundir a través de la matriz de exopolisacáridos (EPS) y desestabilizarla debido a sus características antimicrobianas intrínsecas (Ouhayoun, 2003).

Otros AE como CM y TL inhibieron la formación de *biofilm*, con un porcentaje mayor al 53%. En este caso, el AE de CM al igual que los anteriores presentó actividad antimicrobiana. El AE de LOF sólo presentó actividad frente a *S. Enteritidis* inhibiendo el *biofilm* en un 64.38% (CMI= 1.5 mg/mL). Así, los AE de LOF y TL a pesar de no presentar actividad antimicrobiana, indican su potencial como agentes anti-*biofilm*.

Tabla 3. Efecto de los AE sobre la formación del *biofilm* en *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* ATCC 13076. El porcentaje de inhibición fue calculado respecto al control (microorganismos sin tratamiento del AE). (ND) Actividad anti-*biofilm* no detectada.

Aceites esenciales		<i>S. Typhimurium</i>		<i>S. Enteritidis</i>	
		ATCC 14028		ATCC 13076	
Código	Especie	CMI	%	CMI	%
		Inhibición		Inhibición	
LACA	<i>Lippia alba</i> (carvona)	>1.5	ND	>1.5	ND
LACI	<i>Lippia alba</i> (citrál)	>1.5	ND	>1.5	ND
CN	<i>Cymbopogon nardus</i>	>1.5	ND	>1.5	ND
CM	<i>Cymbopogon martini</i>	0.37	60.01	1.5	62.52
CF	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	>1.5	ND	>1.5	ND
LOT	<i>Lippia origanoides</i> Timol	0.18	62.18	0.37	61.32
LOC	<i>Lippia origanoides</i> Carvacrol	0.18	66.64	0.18	65.64
LOF	<i>Lippia origanoides</i> Felandreno	>1.5	ND	1.5	64.38
RO	<i>Rosmarinus officinalis</i>	>1.5	ND	>1.5	ND
SO	<i>Salvia officinalis</i>	>1.5	ND	>1.5	ND

SG	<i>Swinglea glutinosa</i>	>1.5	ND	>1.5	ND
TL	<i>Tagetes lucida</i>	1.5	53.00	1.5	67.02
TV	<i>Thymus vulgaris</i>	0.75	59.33	0.37	68.52
SV	<i>Satureja viminea</i>	>1.5	ND	>1.5	ND
CO	<i>Cananga odorata</i>	>1.5	ND	>1.5	ND

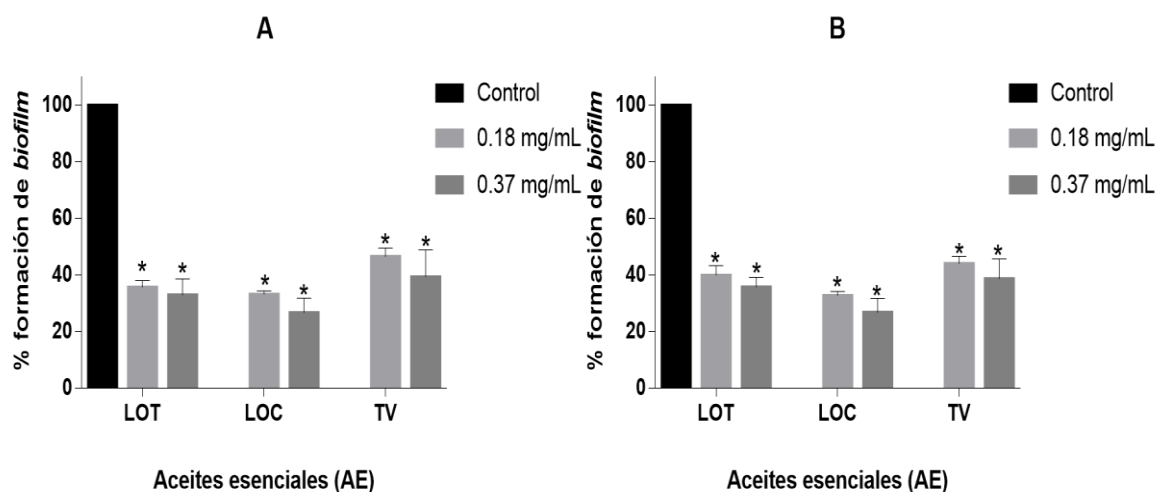


Figura 1. Efectos de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* quimiotipo Timol (LOT), *Lippia origanoides* quimiotipo carvacrol (LOC) y *Thymus vulgaris* (TV) en la formación de *biofilm* en *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium (A) y *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis (B). *P<0.05.

4.4 Inhibición de quorum sensing por aceites esenciales

Se determinó la actividad antimicrobiana de los AE *in vitro* sobre *C. violaceum* CV026 mediante el protocolo de microdilución en caldo. Los valores de la CMI se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los 15 AE sobre *Chromobacterium violaceum* CV026. Los valores están expresados en mg/mL, cada experimento fue llevado a cabo por triplicado.

Aceites esenciales		<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026
Código	Especie	CMI (mg/mL)
LACA	<i>Lippia alba</i> (carvona)	0.75
LACI	<i>Lippia alba</i> (citral)	>1.5
CN	<i>Cymbopogon nardus</i>	>1.5
CM	<i>Cymbopogon martini</i>	0.375
CF	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	0.75
LOT	<i>Lippia origanoides</i> Timol	0.37
LOC	<i>Lippia origanoides</i> Carvacrol	0.37
LOF	<i>Lippia origanoides</i> Felandreno	0.75
RO	<i>Rosmarinus officinalis</i>	>1.5
SO	<i>Salvia officinalis</i>	>1.5
SG	<i>Swinglea glutinosa</i>	>1.5
TL	<i>Tagetes lucida</i>	>1.5
TV	<i>Thymus vulgaris</i>	0.18
SV	<i>Satureja viminea</i>	0.75
CO	<i>Cananga odorata</i>	0.75

Los resultados anteriores indican que 9 AE (LACA, CM, CF, LOT, LOC, LOF, TV, SV Y CO) mostraron actividad antimicrobiana sobre el biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026. Los

AE de LOT y LOC presentaron los valores de CMI más bajos (0.18 mg/mL), resultados que concuerdan con los obtenidos para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (Tabla 2 y 3).

El potencial anti-*quorum sensing* de los 15 AE, se evaluó mediante la cuantificación del pigmento violaceína, producido por el biosensor CV026. Los AE que presentaron actividad antimicrobiana fueron probados a concentraciones sub-inhedoras. De los 15 AE, solo el aceite esencial de LOC presentó diferencias significativas en la producción del pigmento, lo cual indicó su actividad anti-*quorum sensing*. (Figura 2).

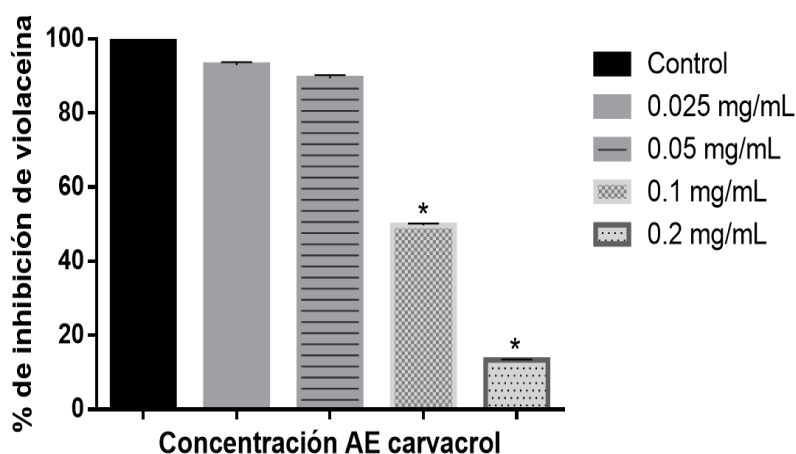


Figura 2. Porcentaje de inhibición de la producción de violaceína en *Chromobacterium violaceum* CV026 tratado con concentraciones sub-inhedoras AE de *Lippia origanoides* carvacrol. * $P < 0.05$.

4.5 Evaluación de la citotoxicidad de los aceites esenciales usando modelos de líneas eucariotas

Se evaluó la citotoxicidad de los AE más promisorios sobre la línea celular Vero (riñón de mono verde africano, ATCC N° CCL-81).

Los resultados obtenidos evidenciaron diferencias significativas en la viabilidad celular al ser tratadas con diferentes concentraciones de AE, excepto el AE de TL (0.37 mg/mL) (Figura 3). Los

AE CM, LOT, LOC y TV presentaron los porcentajes de viabilidad celular más bajos en presencia del AE (1.5 mg/mL). Mientras que al disminuir la concentración de los AE (0.75 mg/mL y 0.37 mg/mL) aumentó el porcentaje de viabilidad (>50%).

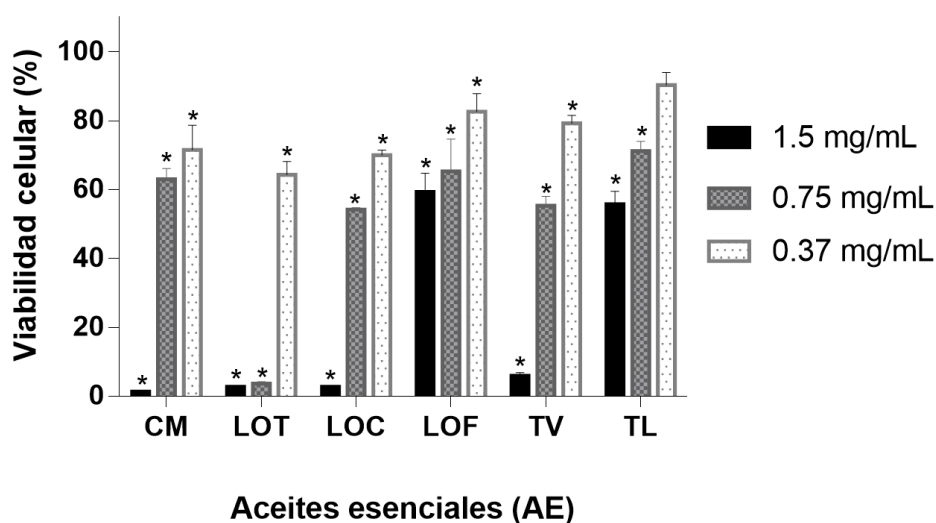


Figura 3. Efecto de la viabilidad celular de células Vero (riñón de mono verde africano, ATCC N° CCL-81) al ser tratadas con diferentes concentraciones de aceites esenciales (1.5 mg/mL- 0.37 mg/mL). * P < 0.05.

Adicionalmente se determinó el índice de selectividad (SI) con el objetivo de analizar si los AE analizados tienen mayor actividad antibacteriana que citotóxica (Tabla 5). Se consideran selectivos los compuestos con un $SI \geq 3$ (Prayong, Barusrux, & Weerapreeyakul, 2008). Ninguno de los AE mostró un $SI \geq 3$. El SI más alto se observó en el AE de LOC frente a *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* ($SI = 2.01$).

Tabla 5. Concentración inhibitoria (IC50) e índice de selectividad (SI) de los AE. (ND) Actividad anti-*biofilm* no detectada.

Aceites esenciales		CC ₅₀	SI	
Código	Especies		S. Typhimurium ATCC 14028	S. Enteritidis ATCC 13076
CM	<i>Cymbopogon martini</i>	0.80	1.06	1.06
LOT	<i>Lippia origanoides</i> Timol	0.31	0.41	0.84
LOC	<i>Lippia origanoides</i> Carvacrol	0.74	2.01	2.01
LOF	<i>Lippia origanoides</i> Felandreno	>1.5	ND	1.25
TL	<i>Tagetes lucida</i>	>1.5	1.09	1.09
TV	<i>Thymus vulgaris</i>	0.82	1.09	1.09

4.6 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las células del *biofilm* de *S. enterica* serovariedad Enteritidis y *S. enterica* serovariedad Typhimurium mostraron diferencias en la densidad celular y en la morfología bacteriana al ser tratadas con el AE de LOC. En las micrografías del *biofilm* no tratado de *S. Enteritidis*, se observaron microorganismos de forma bacilar, lisos, embebidos en una matriz extracelular de polisacáridos densa, con un tamaño bacteriano promedio de 1102±180 nm (Figura 4A). Mientras que las bacterias tratadas con el AE presentaron una disminución de la matriz de exopolisacáridos,

células más dispersas y morfológicamente irregulares, con un tamaño promedio de 1450 ± 199 nm (Figura 4B).

Algo similar se puede observar en las micrografías de *S. Typhimurium*, donde se visualiza una abundante formación del *biofilm* y las características morfológicas bacilares regulares de los microorganismos, con un tamaño promedio de 1869 ± 395 nm (Figura 4C). En el *biofilm* tratado con el AE de LOC se ve claramente una disminución celular y cambios en la morfología bacteriana (Figura 4D).

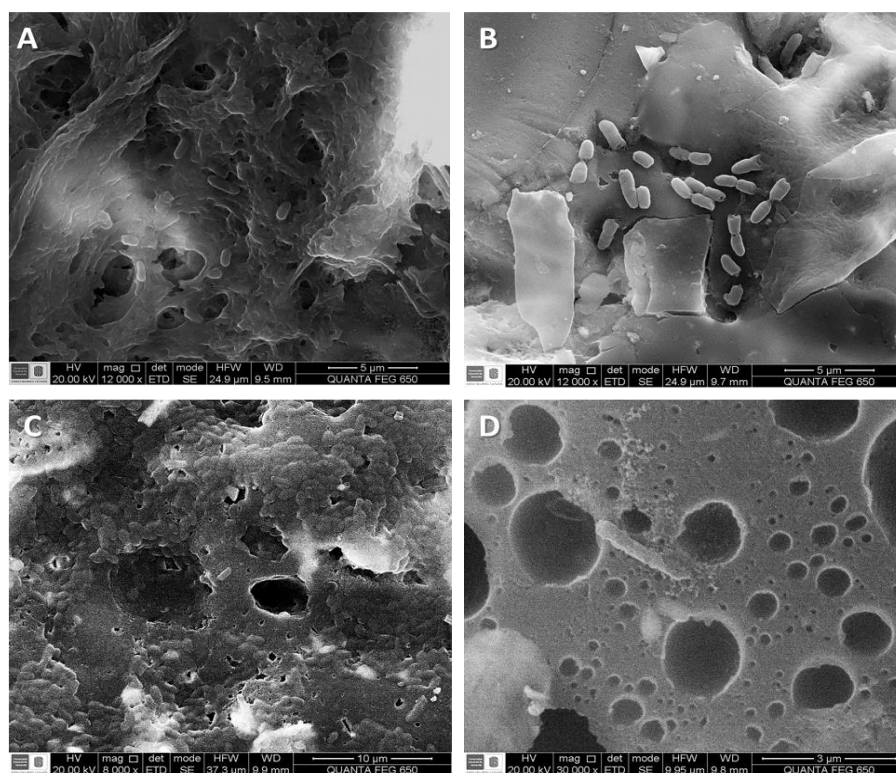


Figura 4. Micrografías del *biofilm* de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* sobre cupones de vidrio esmerilado obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). (A) *Biofilm* de *S. Enteritidis* sin tratamiento. (B) *Biofilm* de *S. Enteritidis* tratado con concentraciones sub-inhedoras del AE LOC. (C) *Biofilm* de *S. Typhimurium* sin tratamiento. (D) *Biofilm* de *S. Typhimurium* tratado con concentraciones sub-inhedoras del AE LOC.

4.7 Análisis de la expresión de genes involucrados en *quorum sensing* y en la formación del *biofilm*

Para determinar el posible mecanismo de acción del AE de LOC sobre la inhibición del *biofilm* y el *quorum sensing* en *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* se realizó el análisis de la expresión diferencial de los genes del sistema de QS; AI-1 (*SdiA*, *LuxR*), AI-2 (*luxS*) y el AI-3 (*QseB*), en células tratadas y no tratadas, mediante RT-qPCR. Los resultados mostraron diferencias significativas en los cambios de la expresión relativa de los genes en las células planctónicas y en las células del *biofilm* para ambos microorganismos (Figura 5).

En las células del *biofilm* se observó una disminución en la expresión relativa de los genes estudiados en comparación con las células sin tratamiento. En ninguno de los casos, a excepción de *LuxR* en células planctónicas ocurrió una sobreexpresión.

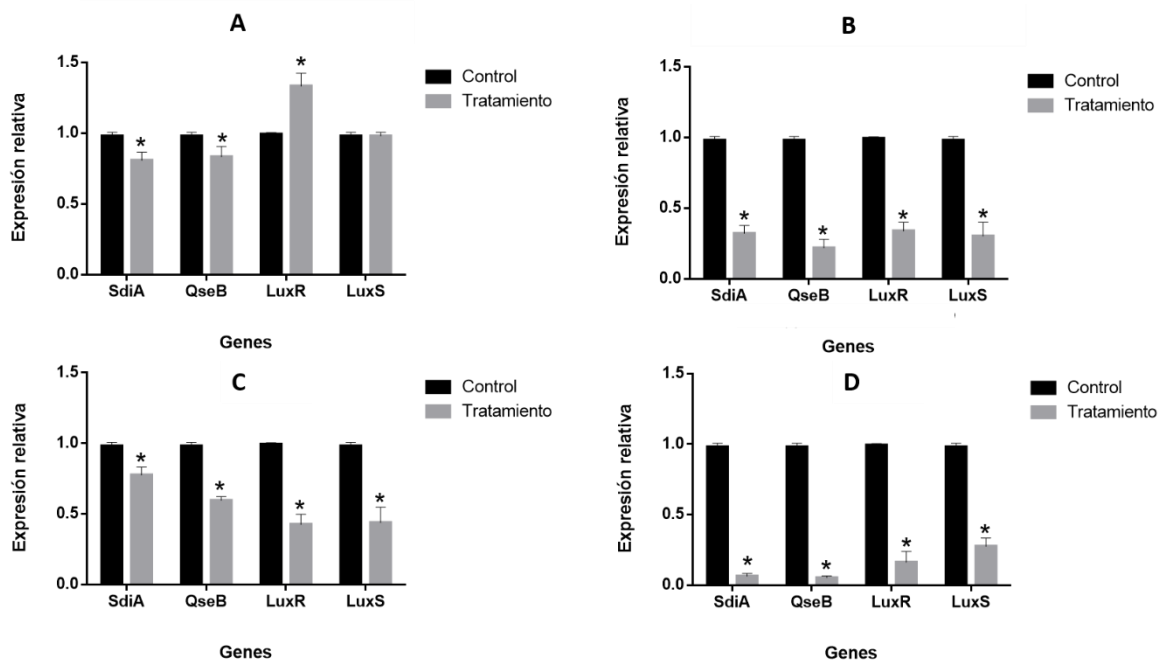


Figura 5. Perfiles transcripcionales de *S. Enteritidis* en estado planctónico (A) y *biofilm* (B) y *S. Typhimurium* en estado planctónico (C) y *biofilm* (D) tratadas con o sin AE de LOC. La expresión relativa de los genes diana fue normalizada al gen de referencia *gst*. Los datos representan los niveles transcripcionales después del tratamiento con aceite de LOC versus controles no tratados (valor 1.0). * P < 0.05.

5. Discusión

La infección por Salmonelosis no tifoidea es una problemática a nivel mundial, la falta de terapias efectivas, la multiresistencia a antibióticos y la capacidad de la formación de *biofilm* son algunas de las principales causas del incremento de enfermedades bacterianas (Crump & Heyderman, 2015). Por lo tanto, se hace necesario el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos que permitan mitigar o evadir la resistencia de patógenos de alta incidencia como bacterias del género *Salmonella*.

En este estudio se evaluó el efecto antimicrobiano, anti-*biofilm* y anti-*quorum sensing* de 15 aceites esenciales. Los componentes mayoritarios de los AE presentaron concordancia con los reportados en la literatura (Tabla 1) (Kalagatur, Ghosh, & Sundararaj, 2018; Mar, Silva, Azevedo, França, & Goes, 2017; Med Raâfet Ben Khedher, Saoussen Ben Khedher, Ikbâl Chaieb, Slim Tounsi, 2017; Mekonnen, Yitayew, Tesema, & Taddese, 2016; Satyal, Murray, Mcfeeters, & Setzer, 2016; Wei & Wee, 2013; Zhang, Zhang, Feng, & Yao, 2016). Sin embargo, es importante mencionar que la proporción de los compuestos químicos depende de varios factores, incluidos la ubicación geográfica, las temporadas de colecta, las condiciones climáticas, entre otros. Esto puede explicar, las diferencias entre las proporciones de los compuestos químicos, con los resultados obtenidos en los diferentes estudios (Swamy, Akhtar, & Sinniah, 2016).

La actividad antimicrobiana de los AE estuvo determinada por la composición química, los grupos funcionales presentes en los componentes activos y las interacciones sinérgicas entre los compuestos (Bakkali & Idaomar, 2008; Chouhan, Sharma, & Guleria, 2017). Los AE con mayor actividad antibacteriana sobre *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis y *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium presentaron un alto contenido de compuestos fenólicos como timol

(LOT, LOC y TV) y carvacrol (LOT y LOC), los cuales permite una permeabilización seguida a la pérdida de iones, pérdida del potencial de membrana, colapso de la bomba de protones y agotamiento del grupo de trifosfato de adenosina que retardan o inhiben el crecimiento de los microorganismos (Gyawali & Ibrahim, 2014).

De igual manera, Sarrazin *et al.* 2015 confirmaron el efecto antimicrobiano del AE de *Lippia origanoides* sobre microorganismos transmitidos por alimentos. Los autores atribuyen la inhibición microbiana a los compuestos oxigenados. Adicionalmente, infirieron que la actividad inherente de los AE no depende de los componentes mayoritarios, sino también de las interacciones de todos los componentes del AE, así, por ejemplo, el p-cimeno (precursor biosintético de estos compuestos) no es un agente antimicrobiano eficiente cuando se usa individualmente, pero en conjunto, potencializa la acción del AE (Hyldgaard, Mygind, Meyer, & Debabov, 2012; Sarrazin *et al.*, 2015).

Además, Mazzarrino *et al.* 2015 encontraron que el AE de *Thymus vulgaris*, presentó una actividad antimicrobiana frente a cepas de *Salmonella* (Mazzarrino *et al.*, 2015). Boskovic *et al.*, determinaron la CMI del AE de TV sobre *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *S. Typhimurium* ATCC 14028, obteniendo resultados similares a los de este estudio (CMI=0,32 mg/mL), para ambos microorganismos (Boskovic, Zdravkovic, Ivanovic, & Janjic, 2015).

Por otro lado, el AE de CM presentó actividad antimicrobiana frente a *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, lo cual se ha asociado con un alto contenido de monoterpenos oxigenados como el

geraniol (Duarte et al., 2007), compuesto que ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antimicrobianas (Ncc & A, 2010; Si et al., 2006).

Los AE mencionados anteriormente, también inhibieron la formación del *biofilm* de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en un 60% a concentraciones sub-inhedoras. Uno de los mecanismos de acción de los AE, ha sido atribuido a la posible interacción de los componentes del AE con las proteínas de la membrana bacteriana, disminuyendo la unión de las células planctónicas a las superficies (Nostro et al., 2007). Otro mecanismo reportado, es la reducción de la motilidad y la interferencia de la producción de adhesinas o apéndices como las proteínas curli y flagelos (Simm, Morr, Kader, Nimtz, & Römling, 2004; Toyofuku et al., 2016). Lo anterior concuerda con los resultados de Soni et al., en donde el AE de tomillo y orégano a concentraciones no letales, así como su componente antimicrobiano fenólico (carvacrol) inhiben la formación de *biofilm* de *Salmonella* (Soni et al., 2013).

Adicionalmente, los AE de TL y LOF presentaron actividad anti-*biofilm*, la cual no ha sido reportada para *Salmonella*. Sin embargo, varios de los compuestos mayoritarios de estos AE, como el estragol y el 1-8 cineol respectivamente, han sido estudiados sobre varios microorganismos (Bagamboula, Uyttendaele, & Debevere, 2004; Kifer, Mu, & Maja, 2016).

Las micrografías de las células sésiles, también permitieron verificar la propiedad anti-*biofilm* del AE de LOC (Figura 4). El *biofilm* sin tratamiento mostró la presencia de microcolonias embebidas en la matriz de exopolisacáridos, característica del *biofilm* bacteriano (Oliveira, Brugnera, & Piccoli, 2010); mientras que, en las células tratadas, no se observaron las

microcolonias y se observó una disminución o ausencia de la matriz de exopolisacáridos. A su vez, se observó, una disrupción de la membrana citoplasmática de la bacteria. Bridier *et al.* 2014, sugieren que a medida que el *biofilm* se desintegra, las bacterias están más expuestas, lo cual facilita la acción de los AE (Bridier, Guilbaud, Piard, Naïtali, & Briandet, 2014).

Así mismo, se evaluó la actividad anti-*quorum sensing* de los AE sobre el biosensor *C. violaceum* CV026. Los resultados indicaron que el AE de LOC fue el único que presentó inhibición en la producción de violaceína, sin afectar el crecimiento microbiano. La actividad del AE se puede atribuir a sus componentes bioactivos como el *carvacrol*, el cual ha sido reportado en estudios anteriores (Joshi, Khazanov, Senderowitz, & Burdman, 2016; Rodriguez-garcia et al., 2014). Este compuesto puede interferir en las rutas del *QS*, inhibiendo la capacidad de los microorganismos de controlar la densidad celular dentro de la población y por lo tanto, interrumpiendo la activación del mismo (Tapia-rodriguez et al., 2017). Además, es posible que el AE a concentraciones sub-inhedoras reduzca la desestabilización de la membrana citoplasmática, lo cual no ocasionaría efectos bactericidas, pero si podría afectar la expresión de los genes de las Acil-homoserinas lactonas, los receptores de las AHL, o la actividad de la AHL-sintasa (Burt, Ojo-fakunle, Woertman, & Veldhuizen, 2014).

Los ensayos transcripcionales y fenotípicos permitieron inferir el posible mecanismo de acción del AE de LOC. Uno de los posibles mecanismos está relacionado con la inhibición de la biosíntesis de la molécula señal o recepción de la señal de acil homoserina lactona y el otro mecanismos con la inactivación enzimática y biodegradación de moléculas de *QS* (Rodriguez-garcia et al., 2014), lo cual puede ser explicado con la significativa disminución de la expresión

relativa de los genes. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para confirmar las presunciones del mecanismo de acción de AE.

La actividad citotóxica de los AE que presentaron algún tipo de propiedad biológica sobre *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* fue determinada para evaluar las posibles aplicaciones farmacéuticas de los compuestos (Chhabra, Bucher, Wolfe, & Portier, 2003). Los resultados de la citotoxicidad de los AE dependieron de la concentración del AE. Los AE de LOT, LOC y TV fueron citotóxicos a concentraciones mayores a las que presentan actividad biológica. La citotoxicidad de estos AE, se puede atribuir al alto contenido de compuestos oxigenados presentes en la mezcla del AE. El timol, por ejemplo, presenta un uso limitado en fármacos debido a su toxicidad moderada, la cual ha sido demostrada tanto *in vitro* en células de mamífero, como *in vivo* en estudios con animales (Manabe, Nakayama, & Sakamoto, 1987; Marchese et al., 2016; Suzuki, Nakamura, Katsumi, & Hiroaki, 1987). Se ha demostrado además, que los AE del género *Cymbopogon* exhiben una actividad citotóxica, la cual puede deberse a su alto contenido de citrales (geranial y neral). Estos compuestos, han demostrado un efecto citotóxico *in vitro* en células Vero y en otras líneas celulares como Hela y MCF-7 (Mesa-arango et al., 2009; Stone et al., 2013). Adicionalmente, algunos autores han señalado que las propiedades citotóxicas de varios aceites esenciales y sus componentes están vinculados a una actividad anticancerígena (Bakkali & Idaomar, 2008; Unlu, Ergene, & Zeytinoglu, 2018).

Por otro lado, los AE de TL y LOF no presentaron actividad citotóxica en las concentraciones probadas. Lo que indica, que la actividad citotóxica está relacionada con los componentes del AE. Sin embargo, es importante mencionar que los resultados de citotoxicidad *in vitro* pueden

sobreestimar la toxicidad de los compuestos *in vivo*, pues las estructuras tisulares y los procesos de biotransformación y transporte no pueden simularse completamente en el cultivo celular (Reichling, Schnitzler, Suschke, & Saller, 2009).

6. Conclusiones

Los AE con mayor contenido de compuestos hidroxilados fueron los más promisorios, siendo el AE de LOC el que presentó la mayor actividad antimicrobiana sobre *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, con una CMI₅₀ de 0.37 mg/mL y una CMB de 0.75 mg/mL.

Los AE con mayor potencial anti-*biofilm* fueron LOT y LOC, los cuales inhibieron la formación del *biofilm* en un porcentaje mayor al 60% (CMI= 0.18 mg/mL) frente a *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

Se demostró la propiedad *anti-quorum sensing* del AE de LOC, sobre la cepa *C. violaceum* CV026, evidenciado en la inhibición de la producción de violaceina a concentraciones subinhibitorias (0.2 mg/mL).

Los AE no presentaron actividad citotóxica en las concentraciones en las que presentan propiedades biológicas, lo cual indica su posible uso en el desarrollo de nuevos tratamientos contra infecciones causadas por *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

El estudio de la regulación de la expresión diferencial de los genes *LuxR*, *LuxS*, *sdiA* y *QseB*, involucrados en el *quorum sensing* y formación del *biofilm* permitió determinar que la formación

del *biofilm* en *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* está regulada principalmente por el mecanismo de comunicación celular *quorum sensing*.

Bibliografía

- Ahmer, B. M. M. (2004, April). Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04054.x>
- Akova, M. (2016). Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence*, 7(3), 252–266. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1159366>
- Althouse, C., Patterson, S., Fedorka-Cray, P., & Isaacson, R. E. (2003). Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infection and Immunity*, 71(11), 6446–6452. <https://doi.org/10.1128/iai.71.11.6446-6452.2003>
- Antunes, L. C. M., Ferreira, R. B. R., Buckner, M. M. C., & Finlay, B. B. (2010, August). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.038794-0>
- Arnold, J. W., & Yates, I. E. (2009). Interventions for control of *Salmonella*: Clearance of microbial growth from rubber picker fingers. *Poultry Science*, 88(6), 1292–1298. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00391>
- Bączek, K. B., Kosakowska, O., Przybył, J. L., Pióro-Jabrucka, E., Costa, R., Mondello, L., ... Węglarz, Z. (2017). Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *Industrial Crops and Products*, 102, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.009>
- Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*, 21, 33–42. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7)
- Bakkali, F., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review, 46, 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

- Barak, J. D., & Liang, A. S. (2008). Role of soil, crop debris, and a plant pathogen in *Salmonella enterica* contamination of tomato plants. *PLoS ONE*, 3(2), e1657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001657>
- Bauer, W. D., & Robinson, J. B. (2002, June). Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Current Opinion in Biotechnology*. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00310-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00310-5)
- Bennett, R. N., & Wallsgrove, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, 127(4), 617–633. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>
- Bermúdez D., P. M., Rincón G., S. M., & Suárez A., M. C. (2014). Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. aisladas del beneficio porcino en Colombia. *Evaluation of Antimicrobial Susceptibility of Salmonella Spp. Strains Isolated from Pork Carcasses on Colombia.*, 32, 88–94. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=114851780&lang=es&site=ehost-live>
- Boskovic, M., Zdravkovic, N., Ivanovic, J., & Janjic, J. (2015). Antimicrobial activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. *Italian Oral Surgery*, 5, 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.005>
- Bridier, A., Guilbaud, M., Piard, J., Naïtali, M., & Briandet, R. (2014). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>
- Burmølle, M., Thomsen, T. R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homøe, P., ... Bjarnsholt, T. (2010, August). Biofilms in chronic infections - A matter of opportunity - Monospecies

biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00714.x>

Burt, S. A., Ojo-fakunle, V. T. A., Woertman, J., & Veldhuizen, E. J. A. (2014). The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum* and Reduces Bacterial Biofilm Formation at Sub-Lethal Concentrations, *9*(4), 1–6.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093414>

Chhabra, R. S., Bucher, J. R., Wolfe, M., & Portier, C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Program: an overview. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *206*, 437–445.
<https://doi.org/10.1078/1438-4639-00240>

Choo, J. H., Rukayadi, Y., & Hwang, J. K. (2006). Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Letters in Applied Microbiology*, *42*(6), 637–641.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01928.x>

Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils — Present Status and Future Perspectives, 1–21. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>

De Keersmaeckert, S. C. J., Varszegi, C., Van Boxel, N., Habel, L. W., Metzger, K., Daniels, R., ... Vanderleyden, J. (2005). Chemical synthesis of (S)-4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, a bacterial signal molecule precursor, and validation of its activity in *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(20), 19563–19568.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M412660200>

de Kievit, T. R., Iglewski, B. H., Kievit, T. R. De, & Teresa, R. (2000). MINIREVIEW Bacterial *Quorum Sensing* in Pathogenic Relationships. *Infection and Immunity*, *68*(9), 4839–4849.
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.4839-4849.2000.Updated>

- Dong, H., Peng, D., Jiao, X., Zhang, X., Geng, S., & Liu, X. (2011). Roles of the *spiA* gene from *Salmonella* Enteritidis in *biofilm* formation and virulence, 1798–1805. <https://doi.org/10.1099/mic.0.046185-0>
- Duarte, M. C., Leme, E. E., Delarmelina, C., Soares, A., Figueira, G., & Sartoratto, A. (2007). r ' s pe Au th o rs on Activity of essential oils from Brazilian medicinal. *Ethonopharmacology*, 111, 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.034>
- Fischer, E. R., Hansen, B. T., Nair, V., Hoyt, F. H., & Dorward, D. W. (2013). *Scanning Electron Microscopy*. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc02b02s25>. Scanning
- Foley, S. L., Johnson, T. J., Ricke, S. C., Nayak, R., & Danzeisen, J. (2013). *Salmonella* Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated, 77(4), 582–607. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-13>
- Galloway, W. R. J. D., Hodgkinson, J. T., Bowden, S. D., Welch, M., & Spring, D. R. (2011). *Quorum sensing* in Gram-negative bacteria: Small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chemical Reviews*, 111(1), 28–67. <https://doi.org/10.1021/cr100109t>
- Gonzalez, J. E., & Keshavan, N. D. (2006). Messing with Bacterial *Quorum Sensing*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 859–875. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00002-06>
- Gonzalez Pedraza, J. B., Sanandres, N. P., Varela, Z. S., Aguirre, E. H., & Camacho, J. V. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*, 30(1), 73–94. <https://doi.org/10.14482/sun.30.1.4316>
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412–429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>
- Hajlaoui, H., Hedi, M., Aouni, M., & Gharsallah, N. (2018). Chemical composition and in vitro

- evaluation of antioxidant , antimicrobial , cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L . essential oil *Microbial Pathogenesis Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant , antimicrobial , cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L . essential oil*, (October). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.03.003>
- Holm, A., & Vikström, E. (2014). Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Frontiers in Plant Science*, 5(June), 309. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00309>
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L., & Debabov, D. (2012). Essential oils in food preservation : mode of action , synergies , and interactions with food matrix components, 3(January), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Islam, M., Morgan, J., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., & Jiang, X. (2004). Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2497–2502. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2497-2502.2004>
- Joo, H., & Otto, M. (2012). Review Molecular Basis of In Vivo Biofilm Formation by Bacterial Pathogens. *Chemistry & Biology*, 19(12), 1503–1513. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.10.022>
- Joshi, J. R., Khazanov, N., Senderowitz, H., & Burdman, S. (2016). Plant phenolic volatiles inhibit quorum sensing in pectobacteria and reduce their virulence by potential binding to ExpI and ExpR proteins. *Nature Publishing Group*, (March), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep38126>
- Kalagatur, N. K., Ghosh, O. S. N., & Sundararaj, N. (2018). Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles Encapsulated With *Cymbopogon martinii* Essential Oil on Plant Pathogenic

- Fungi *Fusarium graminearum*, 9(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00610>
- Kifer, D., Mu, V., & Maja, Š. (2016). Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes , thymol , menthol and 1 , 8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and bio fi lm growth, (January), 689–696. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.10>
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil , thymol and carvacrol, 453–462.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method, 408, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Manabe, A., Nakayama, S., & Sakamoto, K. (1987). Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes, 84, 77–84.
- Mar, J. M., Silva, L. S., Azevedo, S. G., França, L. P., & Goes, A. F. F. (2017). *Lippia origanoides* essential oil : An e ffi cient alternative to control *Aedes aegypti* , *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. *Industrial Crops & Products*, 111(October), 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.033>
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Lorenzo, D., Nabavi, S. F., ... Mohammad, S. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *FOOD CHEMISTRY*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>
- Mazzarrino, G., Faberi, A., Paparella, A., Chaves-l, C., Sergi, M., Sigismondi, C., ... Serio, A. (2015). *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils, 50, 794–803.
- Med Raâfet Ben Khedher, Saoussen Ben Khedher, Ikbal Chaieb, Slim Tounsi, M. H. (2017).

Original article : CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF.
EXCLI Journal, 160–173.

Mekonnen, A., Yitayew, B., Tesema, A., & Taddese, S. (2016). In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi* , *Matricaria chamomilla* , *Eucalyptus globulus* , and *Rosmarinus officinalis*, 2016.

Meneses ML, L. M. (2011). Biofilms Bacterianos. *Analecta Veterinaria*, 31 (2), 44–49.
<https://doi.org/10.4067/S0718-48162007000100011>

Merighi, M., Carroll-Portillo, A., Septer, A. N., Bhatiya, A., & Gunn, J. S. (2006). Role of *Salmonella enterica* serovar typhimurium two-component system PreA/PreB in modulating PmrA-regulated gene transcription. *Journal of Bacteriology*, 188(1), 141–149.
<https://doi.org/10.1128/JB.188.1.141-149.2006>

Mesa-arango, A. C., Montiel-ramos, J., Zapata, B., Durán, C., Betancur-galvis, L., & Stashenko, E. (2009). Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill .) N . E . Brown : composition , cytotoxicity and antifungal activity, 104(May), 878–884.

Millezi, A. F., Caixeta, D. S., Rossoni, D. F., Cardoso, M. das G., & Piccoli, R. H. (2012). In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *thymus vulgaris*, *cymbopogon citratus* and *laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. *Food Science and Technology (Campinas)*, 32(1), 167–172. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000021>

Mireles, J. R., Toguchi, A., & Harshey, R. M. (2001). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Swarming Mutants with Altered Biofilm-Forming Abilities: Surfactin Inhibits Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, 183(20), 5848–5854.
<https://doi.org/10.1128/JB.183.20.5848-5854.2001>

Moore, B. D., Andrew, R. L., Külheim, C., & Foley, W. J. (2014). Explaining intraspecific

diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *The New Phytologist*, 201(3), 733–750. <https://doi.org/10.1111/nph.12526>

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Mukherjee, S., Moustafa, D., Smith, C. D., Goldberg, J. B., & Bassler, L. (2017). The RhIR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer, 1–25.

Ncc, S., & A, F. J. (2010). Biological properties of medicinal plants : a review of their antimicrobial activity, 16(3), 402–413.

Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., ... Blanco, A. R. (2007). Effects of oregano , carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms Printed in Great Britain, 519–523. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46804-0>

O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*, (47), 353913. <https://doi.org/10.3791/2437>

Oliveira, M. M. M. de, Brugnera, D. F., & Piccoli, R. H. (2010). Biofilmes microbianos na indústria de alimentos : uma revisão Microbial biofilms in the food industry : a review, 69(3), 277–284.

Olivero-Verbel, J., Barreto-Maya, A., Bertel-Sevilla, A., & Stashenko, E. E. (2014). Composition, anti-quorum sensing and antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 759–767. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300001>

- Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance, 877–886.
<https://doi.org/10.1007/s10096-015-2323-z>
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 86–92.
- Ouhayoun, J. P. (2003). Penetrating the plaque biofilm : impact of essential oil mouthwash, 30, 10–12.
- Paredes, D., Ortiz, C., & Torres, R. (2014). Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against escherichia coli O157:H7 and methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA). *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 1717–1729. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57156>
- Piatek, J., Sommermeyer, H., Bernatek, M., Ciecelska-Rybarczyk, A., Oleskow, B., Mikkelsen, L. S., & Barken, K. B. (2019). (2019). Persistent infection by Salmonella enterica serovar Typhimurium : are synbiotics a therapeutic option ? – a case report Abstract, 10(2), 211–217.
<https://doi.org/10.3920/BM2018.0080>
- Prayong, P., Barusrux, S., & Weerapreeyakul, N. (2008). Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*, 79(7–8), 598–601.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.06.007>
- Prouty, A. M., & Gunn, J. S. (2003). Comparative analysis of Salmonella enterica serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infection and Immunity*, 71(12), 7154–7158. <https://doi.org/10.1128/iai.71.12.7154-7158.2003>
- Quesada, A., Reginatto, G. A., Español, A. R., Colantonio, L. D., & Burrone, M. S. (2016). Resistencia antimicrobiana de salmonella spp aislada de alimentos de origen animal para

- consumo humano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 33(1), 32–44. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.331.1899>
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., & Saller, R. (2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial , Antifungal , Antiviral , and Cytotoxic Properties – an Overview, 79–90. <https://doi.org/10.1159/000207196>
- Ricke, S. C. (2003). The Gastrointestinal Tract Ecology of Salmonella Enteritidis Colonization in Molting Hens. *Poultry Science*, 82, 1003–1007.
- Rivera Calderon, L. G., Motta Delgado, P. A., Ceron Urbano, M. F., & Chimonja Coy, F. A. (2012). Resistance of Salmonella to conventional antimicrobials for their treatment. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7(1), 115-127. 81 ref. Retrieved from http://www.revistamvzces.com/revistas/vol7no1/Articulo_9.pdf;
http://tc.liblink.umn.edu/sfx_local?sid=OVID:cabadb&id=pmid:&id=doi:&issn=1900-9607&isbn=&volume=7&issue=1&spage=115&pages=115-127&date=2012&title=Revista+CES+Medicina+Veterinaria+y+Zootecnia&a
- Rodriguez-garcia, I., Gonzalez-aguilar, G. A., Ponce, A., Moreira, M. R., Roura, S. I., & Ayala-zavala, J. F. (2014). Oregano essential oil-pectin edible films as anti- quorum sensing and food antimicrobial agents, 5(December), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00699>
- Sarrazin, S. L. F., Silva, L. A., Oliveira, R. B., Raposo, J. D. A., Kelly, J., Silva, R., ... Mourão, R. H. V. (2015). Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Lipids in Health and Disease*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0146-7>
- Satyal, P., Murray, B. L., Mcfeeters, R. L., & Setzer, W. N. (2016). Essential Oil Characterization of *Thymus vulgaris* from Various Geographical Locations, 1–12.

<https://doi.org/10.3390/foods5040070>

- Savoia, D. (2012). Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiol*, 7(August 2012), 979–990. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.68>
- Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H. (2014). Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(5), 625–644. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.599504>
- Sepahi, E., Tarighi, S., Ahmadi, F. S., & Bagheri, A. (2015). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by two herbal essential oils from Apiaceae family. *Journal of Microbiology*, 53(2), 176–180. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-4203-8>
- Sepúlveda-jiménez, G. (2003). Sepúlveda Jiménez, Gabriela; Porta Ducoing, Helena; Rocha Sosa, Mario. *Rev Mex Fitopatol*, 21(3), 355–363. Retrieved from <http://redalyc.uaemex.mx>
- Sharma, V. K., Johnson, N., Cizmas, L., McDonald, T. J., & Kim, H. (2016). Chemosphere A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere*, 150, 702–714. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.084>
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Zhou, T., Yu, H., Poppe, C., ... Du, Z. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria, *100*, 296–305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02789.x>
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., & Römling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility, *53*, 1123–1134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04206.x>
- Singh, B. N., Singh, B. R., Singh, R. L., Prakash, D., Sarma, B. K., & Singh, H. B. (2009). Antioxidant and anti-quorum sensing activities of green pod of *Acacia nilotica* L. *Food and*

Chemical Toxicology, 47(4), 778–786. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.009>

Singh, S., & , Santosh Kumar Singh, I. C. and R. S. (2017). Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to, 53–62. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010053>

Sircili, M. P., Walters, M., Trabulsi, L. R., & Sperandio, V. (2004). Modulation of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence by Quorum Sensing. *Infection and Immunity*, 72(4), 2329–2337. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2329-2337.2004>

Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. (2012, August). Quorum sensing in the context of food microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00468-12>

Skrinjar, M., & Nemet, N. (2009). Antimicrobial effects of spices and herbs essential oils. *Acta Periodica Technologica*, 220(40), 195–209. <https://doi.org/10.2298/APT0940195S>

Smith, Jeneé N., Dyszel, J. L., Soares, J. A., Ellermeier, C. D., Altier, C., Lawhon, S. D., ... Ahmer, B. M. M. (2008). SdiA, an N-acylhomoserine lactone receptor, becomes active during the transit of *Salmonella enterica* through the gastrointestinal tract of turtles. *PLoS ONE*, 3(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002826>

Smith, Jenée N., & Ahmer, B. M. M. (2003). Detection of other microbial species by *Salmonella*: Expression of the SdiA regulon. *Journal of Bacteriology*, 185(4), 1357–1366. <https://doi.org/10.1128/JB.185.4.1357-1366.2003>

Soni, K. A., Oladunjoye, A., Nannapaneni, R., Schilling, M. W. E. S., Silva, J. L., Mikel, B., & Bailey, R. H. (2013). Inhibition and Inactivation of *Salmonella Typhimurium* Biofilms from Polystyrene and Stainless Steel Surfaces by Essential Oils and Phenolic Constituent Carvacrol 3, 76(2), 205–212. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-196>

Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2012). Analyzing

- real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., & Makridis, P. (2013). Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control*, 34(2), 539–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.024>
- Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L., & Švabić-Vlahović, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5), 428–432. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x>
- Stone, S. C., Vasconcellos, F. A., Lenardão, E. J., do Amaral, R. C., Jacob, R. G., & Leite, F. L. (2013). Evaluation of potential use of *Cymbopogon* sp. essential oils, (R)-citronellal and N-citronellylamine in cancer chemotherapy, 6(4), 11–15.
- Suzuki, Y., Nakamura, S., Katsumi, S., & Hiroaki, F. (1987). Differences of superoxide production in blood leukocytes stimulated with thymol between human and non-human primates, 41(4), 1659–1664.
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action : An Updated Review, 2016.
- Tabak, M., Scher, K., Chikindas, M. L., & Yaron, S. (2009). The synergistic activity of triclosan and ciprofloxacin on biofilms of *salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiology Letters*, 301(1), 69–76. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01804.x>
- Tapia-rodriguez, M. R., Hernandez-mendoza, A., Gonzalez-aguilar, G. A., Martinez-tellez, M. A., Miranda, C., & Ayala-zavala, J. F. (2017). Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and bio film production on stainless steel surfaces. *Food Control*, 75, 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.014>

- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *8451*, 1–6. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>
- Unlu, M., Ergene, E., & Zeytinoglu, H. S. (2018). Composition , antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae), (January). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.001>
- Vestby, L. K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E., & Nesse, L. L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research*, *5*(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-20>
- Wei, L. S., & Wee, W. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals, *5*(2), 147–152.
- Whitehead, N. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*(4), 365–404. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(01\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00059-6)
- Winfield, M. D., & Groisman, E. A. (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(7), 3687–3694. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3687-3694.2003>
- Yagi, S., Babiker, R., Tzanova, T., & Schohn, H. (2016). Asian Pacific Journal of Tropical Medicine aromatic plants growing in Sudan. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *9*(8), 763–770. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.009>
- Zhang, N., Zhang, L., Feng, L., & Yao, L. (2016). Phytomedicine The anxiolytic effect of essential oil of *Cananga odorata* exposure on mice and determination of its major active constituents. *Phytomedicine*, *23*(14), 1727–1734. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.10.017>