

# Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de Orégano Mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.)

Genoveva Hernández Zamudio<sup>1\*</sup>, Margarita Guerrero Rodríguez<sup>2</sup>, Rafael Rodríguez Martínez<sup>1</sup>, Sara Elisa Alonzo Rojo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agroecología, Departamento de Ciencias Médico Veterinarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna. 27059. Torreón, Coah., México. <sup>3</sup>Laboratorio de Microbiología de la Unidad Médica de Altas Especialidades No.71 del IMSS. Torreón, Coah., México. E-mail: veva\_hz@yahoo.com (\*Autor responsable).

## Abstract

The antibacterial activity, and components of the essential oil obtained by hidrodestilation of the aerial parts (leaves and flowers) of *Lippia graveolens* H.B.K. plants, collected in Torreón, Coah., Mexico, were assayed. The analysis of the main constituent members (CP) was performed by means of nuclear magnetic resonance (R M N) of <sup>13</sup>C, and antibacterial activity. Determining the minimal inhibitory concentration was performed by the method of broth dilution, using *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 strains, and two isolated strains of cow milk with mastitis: *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The main obtained constituent members were: carvacrol (72 %) and its precursor, p-cymeno (28 %). Both percentages were high in relation to the reported ones in other assays (0,02 to 44,8 % for carvacrol and 6,8 to 21,8 % for p-cymeno). As compared with the ATCC strains, *E. coli* and *S. aureus* isolated of milk with mastitis were more sensitive to the oregano oil (10 vs  $\mu\text{L mL}^{-1}$  in *E. coli* and 5 vs 1.25 in *S. aureus* ) while *Ps. aureuginosa* required 2,5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . The antibacterial activity shown by the oregano essential oil was effective against the pathogenic bacteria. This demonstrates its potential use as a therapeutic agent.

**Key Words:** Bacteria, method of dilution, hidrodestilation, carvacrol, p-cymeno

## Resumen

Se estudiaron los componentes y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Lippia graveolens* H.B.K. colectado en Torreón, Coahuila, México, obtenido por hidrodestilación de las partes aéreas (hojas y flores). El análisis de los constituyentes principales (CP) se realizó por resonancia magnética nuclear (RMN) de <sup>13</sup>C y la actividad antibacteriana, determinando la concentración mínima inhibitoria se realizó por el método de dilución en caldo, utilizando cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y dos cepas aisladas de leche de vaca con mastitis: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los principales constituyentes obtenidos fueron: carvacrol (72 %) y su precursor, p-cymeno (28 %). Ambos porcentajes fueron elevados respecto a los reportados en otros estudios (0.02 a 44.8 % para el carvacrol y 6.8 a 21.8 % para p-cymeno). En comparación con las cepas ATCC, *E. coli* y *S. aureus* aisladas de leche con mastitis fueron más sensibles al aceite de orégano (10 vs 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  en *E. coli* y 5 vs 1.25 en *S. aureus*) mientras que *Ps. aureuginosa* requirió 2.5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . La actividad antibacteriana mostrada por el aceite esencial de orégano fue efectiva contra las bacterias patógenas probadas, lo que demuestra su potencial uso como agente terapéutico.

**Palabras clave:** Bacterias, método de dilución, hidrodestilación, carvacrol, p-cymeno

## Introducción

El género *Lippia* (Verbenaceae) incluye, aproximadamente, 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños. Las especies están distribuidas principalmente a lo largo de los países de América del Sur, Centroamérica

y en los territorios de África Tropical (Rastrelli *et al.*, 1998; Pascual *et al.*, 2001). Las plantas de este género se utilizan en forma de té o infusión por poseer propiedades curativas para distintos padecimientos que van desde infecciones respiratorias, digestivas, hipertensión arterial,

antiespasmódico, hasta malaria, sarna, pedunculosis y también como desinfectante bucal (Valentao *et al.*, 2002).

*Lippia graveolens* H.B.K. es una planta fuertemente aromática nativa del sur de Norteamérica, México, Guatemala, Nicaragua, Honduras, Panamá, Guatemala y Colombia (Rastrelli *et al.*, 1998; Salgueiro *et al.*, 2003a; Stashenko *et al.*, 2004). En la medicina folclórica se le conoce como orégano de monte y mejorana (Rastrelli *et al.*, 1998). Esta especie es usada en Centroamérica para el tratamiento de varias enfermedades principalmente desórdenes gastrointestinales y respiratorios (Pascual *et al.*, 2001; Salgueiro *et al.*, 2003a; Stashenko *et al.*, 2004), además de ser empleada como sazónador de alimentos (Pascual *et al.*, 2001).

Los aceites esenciales son productos naturales extraídos de materiales vegetales (Ohno *et al.*, 2003; Bagamboula *et al.*, 2004).

Estudios de los metabolitos secundarios de las plantas muestran que los aceites esenciales son potencialmente utilizables en la medicina y en las industrias alimenticia, farmacéutica y de cosméticos. Generalmente se aíslan de plantas no maderables por métodos de destilación, normalmente por vapor (hidrodestilación), y son mezclas inconstantes de terpenos, principalmente de hemiterpenos [C5], monoterpenos [C10], sesquiterpenos [C15] y diterpenos [C20], aunque también pueden estar presentes una variedad de hidrocarburos alifáticos de peso molecular bajo (lineal, ramificados, saturados y monosaturados), ácidos, alcoholes, aldehídos, acíclicos o lactones, y excepcionalmente compuestos que contienen nitrógeno y azufre. Los terpenos están entre los compuestos responsables de los usos medicinales y culinarios de las plantas aromáticas y en su mayoría derivan de la condensación de unidades de isopreno de cinco-carbonos ramificados y se categorizan según el número de estas unidades presentes en el esqueleto del carbono (Cowan, 1999; Dorman y Deans, 2000).

Los aceites esenciales se usan para infecciones ocasionadas por bacterias y hongos (Hammer *et al.*, 1998), poseen propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Bagamboula *et al.*, 2004), además como fragancias en perfumería y en la industria alimenticia (Kalemba y Kunicka, 2003).

Aunque durante siglos se han reconocido las propiedades antimicrobianas de algunos aceites esenciales derivados de plantas, éstas se han confirmado sólo recientemente y se relacionan con ciertos componentes de los aceites que son particularmente activos, como el carvacrol, timol, citral, geraniol, eugenol, mentol y el aldehído de la canela. Se ha reportado que a concentraciones superiores a 1 mM el carvacrol disminuye

exponencialmente la viabilidad de *Bacillus cereus*. Al mismo tiempo, se observan aumentos en la fluidez de la membrana y el escape de protones y iones de potasio, lo que lleva a una disminución en la pendiente del pH en la membrana citoplasmática, a su colapso y a la inhibición de la síntesis de ATP. Estos eventos son seguidos por la muerte de la célula. (Ultee *et al.*, 1999) Esto ha despertado el interés en los aceites esenciales debido a que se ha sugerido que podrían ser útiles en la erradicación de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Nelson, 2003). En lo que respecta a los compuestos presentes en *L. graveolens*, los principales son el timol y el carvacrol (Pascual *et al.*, 2001) cuyos precursores son el  $\alpha$ -terpineno y p-cimeno respectivamente (Salgueiro *et al.*, 2003b). Estos poseen actividad antibacteriana y tiene aplicación en el tratamiento de enfermedades (Ultee *et al.*, 1999). En la planta la cantidad de aceite esencial y sus componentes varía como resultado de los factores climáticos, el origen geográfico y la fecha de cosecha, encontrándose que su mayor producción se obtiene a finales del período de floración, además el rendimiento también se afecta por el proceso de extracción (Perez-Galindo *et al.*, 2000; Gulluce *et al.*, 2003; Burt, 2004).

Es necesario que la evaluación de la actividad antimicrobiana de un aceite esencial deba acompañarse por la determinación de su composición química (Gulluce *et al.*, 2003). Si los componentes del aceite esencial de *L. graveolens* son los responsables de la actividad antibacteriana y varían de acuerdo con los factores climáticos y fonológicos, se espera que este aceite esencial del Barrial de Guadalupe, municipio de Torreón, Coah., México tenga como componente mayor al carvacrol y, por ende, mayor potencial antibacteriano.

Es por ello que este trabajo se realizó con el objetivo de determinar los principales componentes del aceite esencial de plantas de *L. graveolens* colectadas en el Barrial de Guadalupe, Municipio de Torreón, Coahuila y evaluar su actividad *in vitro* contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

## Materiales y Métodos

### Material vegetativo

De septiembre a noviembre del 2003 se colectaron partes aéreas de plantas silvestres de orégano en floración en el Barrial de Guadalupe, Municipio de Torreón, Coah., México, localizado en las coordenadas geográficas 25° 00' LN y 103° 14' LO y a una altitud de 1320 m. Se depositó un ejemplar con el número 2006 en el Herbario Jorge Saúl Marroquín de la Fuente del Departamento de Agroecología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna.

## Extracción y Análisis de Aceite Esencial

El aceite esencial se extrajo de las partes aéreas de las plantas (hojas y flores) desecadas al sol y tratadas por hidrodestilación durante 3 h, usando un aparato tipo Rotavapor Buche R-114 modificado. El análisis de los componentes del aceite se realizó en el laboratorio de Química Heterocíclica del Departamento de Química del El Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Zacatenco, en la Ciudad de México, mediante el método de espectros de cloroformo deuterado de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$ .

## Cepas Bacterianas

*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron aisladas de las ubres de vacas lecheras con mastitis. *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922 fueron proporcionadas por el Cepario del Laboratorio de Bacteriología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

## Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La estimación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se llevó a cabo por el método de dilución en caldo (Burt, 2004). Las diluciones fueron de 40.0 a 0.078  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de aceite esencial de *Lippia graveolens* al 0.1 % en etanol al 96 % para la solubilidad. Los tubos fueron inoculados con una suspensión de los microorganismos que se ajustó a una densidad de  $2.4 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias de acuerdo al 0.5 nefelómetro de Mc. Farland en 2 mL de infusión cerebro-corazón (Sigma) en tubos de ensayo de 10 mL. Se tomaron los valores de la CMI como la concentración más baja de extracto que completamente inhibió el crecimiento bacteriano después de 24 h de incubación a 37 °C después de lo cual se leyó la absorbancia de cada uno de los tubos en un espectrofotómetro Coleman Junior II. Se usó un testigo sin el extracto. Cada prueba se repitió por lo menos tres veces.

## Resultados y Discusión

El análisis del aceite permitió observar que los dos compuestos más abundantes de la muestra fueron carvacrol con un 72 % y p-cimeno, precursor de carvacrol, con un 28 %. Estos resultados difieren de los obtenidos por Salgueiro *et al.* (2003a), quienes reportaron niveles de 21.8 % de p-cimeno y 44.8 % de carvacrol para su muestra con niveles más altos. Los resultados son importantes debido a que según reportes previos la

actividad antimicrobiana del aceite de orégano depende de su contenido en carvacrol y timol, mientras que por otra parte, los organismos con infecciones bacterianas se benefician por la acción antioxidante de estos compuestos.

Las cepas obtenidas de leche de vacas con mastitis requirieron menos del doble de la concentración para inhibir el crecimiento, que las bacterias ATCC, es decir, las bacterias nativas mostraron mayor susceptibilidad a los efectos antibacterianos del aceite. Por otra parte se observó que las bacterias Gram-negativas (*E. coli*, *E. coli* ATCC 25922) presentaron menor sensibilidad a los efectos antibacterianos del aceite de *L. graveolens*, que las bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *S. aureus* ATCC 25923). *P. aeruginosa* 27853 presentó una CMI de 2.5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (Cuadro 1), por lo que no se encontraron evidencias de que esta bacteria sea capaz de degradar el carvacrol parcialmente (Schwäm mLe *et al.*, 2001).

**Cuadro 1.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Lippia graveolens*.

Bacteria	CMI ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )
<i>Escherichia coli</i>	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2.5

La posibilidad de utilizar en forma extensa el aceite esencial de *L. graveolens* para infecciones bacterianas requiere que se continúe con pruebas *in vitro* para otros grupos bacterianos y de hongos, así como con pruebas *in vivo* para las bacterias que presentaron susceptibilidad en la pruebas *in vitro*. Son necesarios también, más estudios que permitan identificar la farmacodinamia y la farmacocinética de este recurso natural.

## Conclusiones

El aceite esencial de plantas de *Lippia graveolens* colectadas en el ejido Barrial de Guadalupe, municipio de Torreón, Coah., México, tiene un alto contenido de carvacrol por lo que se deduce que es de buena calidad. El aceite esencial de *Lippia graveolens* a bajas concentraciones mostró potencial antibacteriano para inhibir el crecimiento de todas las bacterias probadas pero de mejor manera las Gram-positivas.

## Agradecimiento

Al Establo Beta San Gabriel, S. A. de C.V., por la confianza depositada al permitir la realización del proyecto con su ganado, y por el apoyo económico.

## Literatura Citada

- Bagamboula, C., M. Uyttendaele y J. Debevere. 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. Food Microbiol. 21: 33-42.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. Int. J. Food Microbiol. 94(3): 223-53.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12(4): 564-82.
- Dorman, H. J. y S. G. Deans 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88(2): 308-16.
- Gulluce, M., M. Sokmen, D. Daferera, G. Agar, H. Ozkan, N. Kartal, M. Polissiou, A. Sokmen y F. Sahin 2003. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. J. Agric. Food Chem. 51(14): 3958-65.
- Hammer, K. A., C. F. Carson y T. V. Riley 1998. In vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. J. Antimicrob. Chemother. 42(5): 591-5.
- Kalemba, D. y A. Kunicka 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med. Chem. 10(10): 813-29.
- Nelson, R. R. S. 2003. In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J. Antimicrob. Chemother. 40: 305-6.
- Ohno, T., M. Kita, Y. Yamaoka, S. Imamura, T. Yamamoto, S. Mitsufuji, T. Kodama, K. Kashima y J. Imanishi. 2003. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. Helicobacter 8(3): 207-15.
- Pascual, M. E., K. Slowing, E. Carretero, D. Sanchez Mata y A. Villar. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. J. Ethnopharmacol. 76(3): 201-14.
- Perez-Galindo, J. A., J. Lopez-Miranda y I. R. Martinez-Dominguez. 2000. Geometric and Reynolds number effects on oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil extraction. J. Food Eng. 44: 127-33.
- Rastrelli, L., A. Caceres, C. Morales, F. De Simone y R. Aquino. 1998. Iridoids from *Lippia graveolens*. Phytochemistry 49(6): 1829-1832.
- Salgueiro, L. R., C. Cavaleiro, M. J. Goncalves y A. P. da Cunha. 2003a. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. Planta Medica 69(1): 80-83.
- Salgueiro, L. R., C. Cavaleiro, E. Pinto, C. Pina-Vaz, A. G. Rodrigues, A. Palmeira, C. Tavares, S. Costa-de-Oliveira, M. J. Goncalves y J. Martinez-de-Oliveira. 2003b. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species. Planta Med 69(9): 871-4.
- Schwäm mLe, B., E. Winkelhausen, S. Kuzmanova y W. Steiner. 2001. Isolation of carvacrol assimilating microorganisms. Food Technol. Biotechnol. 39(4): 341-345.
- Stashenko, E. E., B. E. Jaramillo y J. R. Martínez. 2004. Analysis of volatile secondary metabolites from colombian *Xylopiia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. J. Chromatogr. A 1025(1): 105-13.
- Ultee, A., M. H. Bennik y R. Moezelaar. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 68(4): 1561-8.
- Ultee, A., E. P. Kets y E. J. Smid 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 65(10): 4606-4610.
- Valentao, P., E. Fernades, F. Carvalho, P. B. Andrade, R. M. Seabra y M. L. Bastos. 2002. Studies on the Antioxidant Activity of *Lippia citriodora* Infusion: Scavenging Effect on Superoxide Radical, Hydroxyl Radical and Hypochlorous Acid. Biol. Pharm. Bull. 25(10): 1324-1327.
-