

Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales y extractos etanólicos utilizando métodos de difusión en agar y dilución en pozo

Evaluation of antibacterial activity of essential oils and ethanolic extracts using agar diffusion and well dilution methods

Luz Stella Ramírez Aristizabal, Darwin Marín.

Grupo Polifenoles, Universidad Tecnológica de Pereira-CENIVAM, Pereira, Colombia

Correo: luramire@utp.edu.co

Resumen— Se evaluó la actividad antibacteriana, de seis aceites esenciales y cinco extractos etanólicos de diferentes plantas Colombianas, frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, la evaluación de la actividad antibacteriana se realizó por métodos de difusión y dilución, mostrando diferencias significativas en los resultados de actividad, para los aceites esenciales, no obstante para los extractos los resultados fueron similares independientemente del método empleado.

Palabras clave— Actividad antibacteriana, aceites esenciales, extractos etanólicos

Abstract— The antibacterial activity of six essential oils and five ethanolic extracts of various plants of the Colombian, was evaluated against Gram positive and Gram-negative bacteria, the evaluation of antibacterial activity was performed by diffusion and dilution methods, differences were found in the results of activity for essential oils

Key word— Antibacterial activity, essential oils, ethanol extracts

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas son causadas por bacterias, hongos, parásitos y virus, los cuales son transmitidos directa o indirectamente de persona a persona o por medio de vectores. Adicionalmente, algunas enfermedades que se consideraban controladas están emergiendo, incrementando el riesgo de epidemias, afectando la salud humana [1].

El uso masivo de brebajes o emplastes de origen natural para aliviar o prevenir diversas enfermedades humanas, demuestra que los productos naturales ofrecen una valiosa e interesante fuente de medicamentos y ésta que ha sido una práctica milenaria se utiliza actualmente con mayor frecuencia por habitantes de las ciudades más desarrolladas [2]. La importancia de los productos naturales como fuente de medicamentos se observa en el hecho de que el 60% y 75% de los nuevos medicamentos contra enfermedades infecciosas y el cáncer,

comercializados entre 1981 y 2002 respectivamente, fueron obtenidos de fuentes naturales [3]. Por lo anterior, los aceites esenciales (AEs) emergen como una fuente potencial importante para la búsqueda de medicamentos contra enfermedades causadas por microorganismos [4].

Las plantas pueden producir AEs para muchos y diversos fines, entre estos, protección contra plagas, enfermedades y plantas invasoras, así mismo para atraer insectos y aves (polinizadores)[5]; además de recientes aplicaciones en el campo de la nutraceutica, suplementos de alimentos intermediarios farmacéuticos y entidades químicas par los fármacos sintéticos [6]; gracias a ello es que se explora la posibilidad de encontrar diversas actividades biológicas en los AEs.

Cada vez se amplía el interés de los compuestos naturales por la industria farmacéutica para el control de enfermedades humanas, de origen microbiano [7]. Este aspecto asume una relevancia particular debido a la resistencia que están presentando los microorganismos a los antibióticos comunes, haciendo indispensable la búsqueda de nuevas sustancias que permitan contrarrestar los mecanismos de resistencia. Lo anterior requiere investigaciones rigurosas y la validación de pruebas de susceptibilidad antibacteriana, (AST) las cuales son técnicas importantes en muchas disciplinas de la ciencia; son usadas para determinar la resistencia de cepas a antimicrobianos y la eficacia de nuevos fármacos. Los AST son los primeros pasos a desarrollar en la búsqueda de nuevas drogas, son varios los métodos que son empleados por los investigadores y por lo tanto pueden permitir variaciones en los resultados [3]. Los criterios para la evaluación de la actividad antimicrobiana son muy variables y los resultados difieren entre los autores, algunas veces es difícil comparar los resultados obtenidos, cuando se trabaja con extractos de plantas con datos publicados en la literatura porque muchas variables influyen los resultados, tales como: condiciones ambientales y climáticas bajo las cuales las plantas crecen, la elección del método de extracción y el AST

que se utilice [4]. En este trabajo se presentan los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana de algunos aceites esenciales y extractos etanólicos a través de métodos de difusión y dilución.

II. MATERIALES Y METODOS

1) Material Vegetal

En la tabla 1 se relacionan los códigos, las plantas y el tipo de extractos utilizados en el estudio, los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, según la metodología descrita por Stashenko *et al.*[8].

N° (COL)	Nombre científico	Tipo de extracto
480750	<i>Lippia alba</i>	Aceite esencial
520285	<i>Lippia origanoides</i>	Aceite esencial
502030	<i>Cananga odorata</i>	Aceite esencial
512074	<i>Tagetes lúcida</i>	Aceite esencial
487026	<i>Eucaliptus citratus</i>	Aceite esencial
489030	<i>Cymbopogon citratus</i>	Aceite esencial
521064	<i>Salvia rubriflora Kunth</i>	Extracto etanólico
521107	<i>Salvia rubriflora Epling</i>	Extracto etanólico
521062	<i>Sigesbeckia agrestis</i>	Extracto etanólico
521074	<i>Salvia bogotensis</i>	Extracto etanólico
521095	<i>Hyptis perbullata</i>	Extracto etanólico

Tabla 1. Extractos usados

2) Cepas Bacterianas

Se usaron las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC (American type culture collection) 33591, *Salmonella tiphymurium* ATCC 13311, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, y unos aislamientos de *Salmonella gallinarum*, *Escherichia coli* No 1 resistente a amoxicilina, y *Escherichia coli* No 2 sensible a amoxicilina.

3) Evaluación de la actividad antibacteriana

3.1) Método de difusión en agar

Para la evaluación de los extractos y los aceites esenciales contra las cepas bacterianas previamente descritas, los microorganismos se cultivaron en tripticasa soya caldo a 37 °C hasta obtener una absorbancia de 0.1 a 540 nm, lo cual equivale a 1×10^6 células/ml. Posteriormente en cajas de petri se adicionaron 100 µl de cada cepa bacteriana y 25 ml de agar Mueller Hinton, se hicieron 5 pozos de 6 mm de diámetro cada uno, sellando el fondo de cada pozo con 15 µl de agar.

En cada uno de los pozos se adiciono 10 µl de las sustancias a evaluar a concentraciones de 50, 30, y 10 µg/µl solubilizado en dimetilsulfóxido (DMSO) al 30%. Como control positivo se usó amoxicilina 5 µg/µl para *S. gallinarium* *S. tiphymurium*, *E. coli* No 2, *B. cereus*, y *S. aureus*; Trimetropin sulfa para *E. coli* No 1; y como control negativo DMSO. Las cajas se colocaron en refrigeración por una hora para facilitar la pre-difusión de las muestras verificando que no hubiera procesos de precipitación a causa de las bajas temperaturas, luego se incubaron a 37 °C por 24 horas, se midieron los halos de inhibición y se calculó el porcentaje de actividad inhibitoria. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y los resultados son expresados como el promedio de las 3 medidas. Para verificar el crecimiento alrededor del halo se tomó una asada en esa zona, se inoculó en una placa de agar Mueller Hinton y se incubó por 24 horas a 37 °C, y se observó el crecimiento o no de microorganismos.

3.2) Método de dilución

Las pruebas de actividad antimicrobiana por el método de dilución se realizaron sobre cajas de 96 pozos, se prepararon diluciones de los extractos y aceites a 50, 30 y 10 µg/µl solubilizado en DMSO.

En cada pozo se adicionaron 220 µl de caldo Mueller Hinton, 10 µl del microorganismo a 0.1 de absorbancia a 540 nm, y 20 µl de la muestra. Se incubó durante 4 horas a 37 °C, y se utilizó como solución indicadora para la determinación de crecimiento bacteriano Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los análisis de actividad antibacteriana para aceites esenciales, presentaron diferencias en los métodos utilizados; la evaluación por el método de dilución mostró mayor inhibición para todos los microorganismos, en tanto que la inhibición por el método de difusión en agar fue muy poca, la mayor diferencia se presentó para *Cananga odorata* donde solo hubo inhibición de *Salmonella tiphymurium* cuando se evaluó a 50 µg/µl por el método de difusión en agar, en cambio por el método de dilución inhibió a todos los microorganismos a las diferentes concentraciones evaluadas, según se representa en la tabla 2

Es posible que los aceites esenciales evaluados presenten poca capacidad de difusión, por lo que los resultados de inhibición utilizando esta metodología fueron negativos en la mayoría de los casos, lo anterior es consistente con reportes que sugieren que el mayor problema en los AST de difusión es la disponibilidad de los principios bioactivos, lo cual es una función de la solubilidad de los compuestos evaluados [9]. Además los procesos de

difusión dependen de numerosos factores que incluyen número, tamaño y forma de las partículas [10].

Tabla 2: Actividad antibacteriana utilizando las Técnicas de difusión y dilución

Nombre científico	Micro-organismos	Técnica difusión en agar																		Técnica de Micro-dilución																										
		<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311			<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591			<i>Escherichia coli</i> No. 2			<i>Salmonella Gallinarium</i>			<i>Escherichia coli</i> No.1			<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311			<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591			<i>Escherichia coli</i> No. 2			<i>Salmonella Gallinarium</i>			<i>Escherichia coli</i> No.1											
		50	30	10	50	30	10	50	30	10	50	30	10	50	30	10	50	30	10	50	30	10	50	30	10	50	30	10	50	30	10	50	30	10	50	30	10									
Concentraciones (µg/µL)																																														
Tipo de extracto																																														
<i>Lippia alba</i>	Aceites esenciales	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
<i>Lippia origanoides</i>	Aceites esenciales	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cananga odorata</i>	Aceites esenciales	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tagetes lúcida</i>	Aceites esenciales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Eucaliptus citratus</i>	Aceites esenciales	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	
<i>Cymbopogon citratus</i>	Aceites esenciales	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salvia rubriflora Kunth</i>	Ext. Etanólico	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Salvia rubriflora Epling</i>	Ext. Etanólico	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Sigesbeckia agrestis</i>	Ext. Etanólico	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Salvia bogotensis</i>	Ext. Etanólico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hyptis perbullata</i>	Ext. etanólico	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ = Inhibición de la bacteria (Act. antibacterial positiva) - = Actividad antibacterial negativa

La evaluación de los extractos etanólicos utilizando ambas metodologías, presentó similitud en los resultados, la mayoría con actividad negativa. Solo se observó inhibición para microorganismos Gram positivos por parte de los extractos etanólicos lo cual es consistente con múltiples referencias que muestran a los microorganismos Gram positivos más sensibles, a los productos naturales.

Según se observa en la tabla 2 todos los extractos inhibieron al menos un microorganismo, excepto el extracto de *Salvia bogotensis* que no presentó inhibición. El extracto con mayor actividad fue *Sigesbeckia agrestis*, que inhibió los microorganismos Gram positivos *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* a todas las concentraciones evaluadas y se obtuvieron iguales resultados en ambas metodologías. Los demás extractos con actividad positiva solo inhibieron un microorganismo.

Frente a los microorganismos evaluados presentaron mayor actividad inhibitoria los aceites esenciales que los extractos, estas actividades se pueden atribuir a la presencia de compuestos de tipo fenólico como el carvacrol y timol encontrados en estos aceites [11].

Diferencias en la concentración de los componentes de los aceites esenciales, especialmente la variación en las cantidades de los mayores o menores componentes puede ser responsable de las diferencias en la actividad antibacteriana [12].

En los aceites esenciales, la mayoría de aceites que no presento inhibición por la técnica de difusión en agar frente a *B. cereus* y *S. tiphymurium*, si lo hizo por la técnica de dilución, mostrando una mayor sensibilidad de esta técnica para compuestos no polares como los aceites.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En conclusión, estas observaciones indican que el método de dilución provee una mayor sensibilidad cuando se trabaja con aceites, y que se presentan diferencias significativas dependiendo del método utilizado, sin embargo cuando se evalúan sustancias polares no existen diferencias independientemente si la metodologías hace relación a procesos de difusión o de dilución. Lo que sugiere que los métodos de difusión no deben ser elegidos para evaluar muestras no polares ya que se dificulta su dispersión en medios acuosos.

Los resultados confirman que todos los aceites esenciales evaluados poseen actividad antibacteriana *in vitro*, confirmando su actividad de manera más confiable por el método de dilución, lo cual los hace buenos candidatos para encontrar compuestos bioactivos contra bacterias. Por otra parte los extractos etanólicos presentaron poca actividad contra los microorganismos evaluados.

V. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. O-M-S, "Recomendaciones para gobiernos y consumidores acerca del uso de la medicina tradicional, complementaria y alternativa". *J. Public Health*, vol. **16**, pp 218, 2004
- [2]. M. Iwu, A. Duncan, y C. Okunji, "New antimicrobials of plant origin", 1ª ed, 1999, Alexandria, VA: ASHS Press, pp. 457 - 462
- [3]. J. Lampinen. *Continuous Antimicrobial susceptibility testing in drug discovery. Drug Plus International*. 2005 [citado Septiembre 28 de 2011]; de: <http://www.thermo-readingroom>.
- [4]. A. Nostro, M. Germano, V. D'Angelo, A. Marino, y M. Cannatelli, "Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity". *Lett Microbiol* vol. **30**, pp 379-384, 2000
- [5]. M. Tomczykowa, M. Tomczyk, P. Jakoniuk, y E. Tryniszewska, "Antimicrobial and antifungal activities of the extracts and essential oils of *Bidens tripartita*". *Folia Histochem Cytobiol*, vol. **46**, pp 389-393, 2008
- [6]. C. Kuklinski, "Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural", 1ª ed, 2003, Barcelona: Ediciones Omega S.A., pp. 105
- [7]. K. Hammer, C. Carson, y T. Riley, "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts". *J Appl Microbiol*, vol. **86**, pp 985-990, 1999
- [8]. E. Stashenko, B. Jaramillo, y J. Martínez, "Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity". *J Chromatogr*, vol. **1025**, pp 93-103, 2004
- [9]. N. Ncube, A. Afolayan, y A. Okoh, "Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends". *African Journal of Biotechnology*, vol. **7**, pp 1797-1806, 2008
- [10]. I. Heneine, "Biofísica básica", 1ª ed, 2000, Sao Paulo: ATHENEU, pp. 76

- [11]. Ramírez, L. S.; Isaza, J.; Veloza, L. A.; Stashenko, E.; Marín, D. 2009. "*Actividad antibacteriana de aceites esenciales de Lippia origanoides de diferentes orígenes de Colombia. Ciencia*" 17(4): 313-321,2009
- [12]. L. Hongmei, W. Xianjin, Y. Liang, y J. Zhang, "*Variation in Chemical Composition and Antibacterial Activities of Essential Oils from Two Species of Houttuynia thunb*". *Chem Pharm Bull*, vol. **54**, pp 936-940, 2006 .