

Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana *in vitro* de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas

LIBERTAD ALZAMORA¹, LILIANA MORALES¹, LOURDES ARMAS¹, GILMA FERNÁNDEZ²

¹Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas "Antonio Raimondi" Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM. ²Laboratorio de Química Facultad de Ciencias - Universidad Peruana Cayetano Heredia.

RESUMEN

El objetivo fue la investigación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de cinco plantas empleadas en Medicina Tradicional en el Perú: *Eucalyptus globulus*, Labill "eucalipto"; *Cymbopogon citratus*, (D.C.) Staff "hierba luisa"; *Tagetes pusilla* Lag. "Anís serrano"; *Senecio tephrosioides*, Turcz "huamanrripa" y *Lepechinia meyenii*, (Walp) Epling "salvia". Los aceites esenciales obtenidos por destilación por arrastre de vapor, se enfrentaron a *Salmonella typhi* ATCC 6539, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. enteritidis* INS, *Vibrio cholerae* ATCC E-7946 OGAWA, *Pseudomonas aeruginosa* GT 28, *Shigella flexneri* INS, *Staphylococcus aureus* INS, *S. aureus* ATCC 6538P y *Candida albicans* ATCC 10231. Se empleó discos de antibióticos como controles. Los aceites esenciales mostraron efecto variado sobre Gram positivos y Gram negativos; ninguno inhibió a *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras claves: Medicina Tradicional; Aceites Volátiles; Plantas Medicinales; Farmacognosia.

IN VITRO ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL EXTRACTED OILS FROM SOME AROMATIC PLANTS

SUMMARY

The objective was to investigate the antimicrobial qualitative activities of five plants used in Traditional Medicine in Peru: *Eucalyptus globulus*, Labill "eucaliptus"; *Cymbopogon citratus*, (D.C.) Staff "hierba luisa"; *Tagetes pusilla*, Lag "anis serrano"; *Senecio tephrosioides*, Turcz "huamanrripa" y *Lepechinia meyenii*, (Walp) Epling "salvia". The essential oils were prepared by steam distillation and tested against *Salmonella typhi* ATCC 6539, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. enteritidis* INS, *Vibrio cholerae* ATCC E-7946 OGAWA, *Pseudomonas aeruginosa* GT 28, *Shigella flexneri* INS, *Staphylococcus aureus* INS, *S. aureus* ATCC 6538P and *Candida albicans* ATCC 10231. Test was controlled with antibiotic discs. Essential oils showed diverse effects against both Gram positive and Gram negative microorganisms. None of these inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: Medicine, Traditional; Oils, Volatile; Plants, Medicinals; Pharmacognosy.

Correspondencia:

M. Sc. Libertad Alzamora
Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas
"Antonio Raymondí". Facultad de Ciencias Biológicas
Ciudad Universitaria - UNMSM.
E-mail: d190002@unmsm.edu.pe

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas. Están constituidos por terpenos con actividad y composición variada; después de la extracción generalmente son líquidos y rara vez sólidos o pastosos (¹⁻⁵). Diversas investigaciones han permitido establecer su actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e insecticida (⁵⁻¹⁰). *Tagetes pusilla*, Lag "anís serrano" (Asteraceae), se desarrolla en los valles interandinos y ha sido reportada desde México hasta el noroeste de Argentina (¹¹); se utiliza para aliviar malestares estomacales. *Senecio tephrosioides*, Turcz "huamanripa" (Asteraceae), y *Lepechinia meyenii*, (Walp) Epling "salvia" (Lamiaceae), también se desarrolla en los valles interandinos del país (^{12,13}) y se les emplea para el tratamiento de afecciones respiratorias. Estas tres especies son herbáceas y no se ha encontrado reportes acerca del efecto antimicrobiano de sus aceites esenciales.

Eucalyptus globulus, Labill "eucalipto" (Myrtaceae), es un árbol cosmopolita cuyas propiedades antimicrobianas han sido demostradas por otros autores (^{10,14}). *Cymbopogon citratus*, Staff (D.C.) "hierba luisa" (Poaceae), es una herbácea de distribución universal. En el país no se encontró reportes sobre su efecto antimicrobiano, en Africa Onawunni (¹⁵) determinó su poder bactericida.

El objetivo fue la evaluación cualitativa *in vitro* de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales de las cinco plantas aromáticas referidas, sobre diez microorganismos de importancia en salud pública y la validación de su empleo en la Medicina Tradicional peruana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección e identificación taxonómica: *Tagetes pusilla*, *Senecio tephrosioides* y *Lepechinia meyenii* fueron recolectadas de las provincias de Huaraz y Caraz en Ancash; *Eucalyptus globulus* de la provincia de Pampas

en Huancavelica y *Cymbopogon citratus* del valle de Cañete en Lima. Se las identificó según el sistema de Engler & Prant, modificado por Melchior en el Museo de Historia Natural Javier Prado de la UNMSM.

Extracción de aceites esenciales: Por el método de destilación por arrastre de vapor de agua a partir de plantas frescas (⁴).

Microorganismos: *Salmonella typhi* ATCC 6539, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. enteritidis* serotipo Newport INS, *Vibrio cholerae* ATCC E-7946 OGAWA, *Pseudomonas aeruginosa* GT 28, *Shigella flexneri* INS, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *S. aureus* INS, la levadura *Candida albicans* ATCC 10231. (INS: Instituto Nacional de Salud, ATCC: American Type Culture Collection, GT: Hospital Pediátrico de Toronto).

Descripción del método de aromatograma de Duraffourd (³) modificado: Los cultivos fueron estandarizados por turbidimetría con el tubo N° 1 de la escala de Mc Farland (3 x 10⁸ microorganismos por mL). La modificación del método consistió en el uso de agar Infusión Cerebro-Corazón (BHI) a 40-45°C, mezclado con 0,1 mL del cultivo estandarizado, que se vertió sobre una delgada capa base de agar nutritivo solidificado. Duraffourd (³) no empleó la capa base de agar que permitió una mejor visualización de los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo (HICM).

Los discos de papel Whatman N°1 de 6 mm de diámetro fueron impregnados, el mismo día de la prueba, con 5 mL de aceite esencial puro y filtrado; se los aplicó sobre los inóculos y se les incubó a 37°C por 18 horas. La actividad se consideró en función al diámetro del HICM (³): nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (sensible = +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (S.S. = +++) si fue igual o superior a 20 mm.

Elaboración de los perfiles aromáticos: Se trazó los diámetros de los HICM para cada microorganismo, con cada aceite evaluado (³).

Controles positivos: Los antibiogramas fueron realizados en las mismas condiciones que los aromagramas. Se empleó discos de antibióticos comerciales (Emerme, Perú): sulfametoxazol + trimetropim (sxt) 25 mg, tetra-ciclina (Ttr) 20 mg, penicilina V (pni) 10 UI, ampicilina (amp) 25 mg, cloramfenicol (clr) 30 mg. Para *Candida albicans*, se empleó discos impregnados con antimicóticos comerciales en las siguientes concentraciones: micoral (mic) 100 mg; esporostatin (esp) 330 mg, micostatin (mct) 10 000 UI y oxonazol (oxn) 200 mg.

RESULTADOS

Aceites esenciales en las hojas de las plantas aromáticas:

La cantidad de aceite extraído fue variable. En el caso de *T. pusilla* y *C. citratus* se calculó que 1% del peso total de la planta fresca correspondía

a aceite esencial, para *S. tephrosioides* fue 0,8%, para *L. meyenii* 0,8%; *E. globulus* tuvo mayor cantidad, habiéndose obtenido 0,6 mL (3%) por cada 100 g de hojas.

Actividad de los aceites esenciales sobre microorganismos:

Los resultados de la Tabla 1 están referidos al efecto de los aceites sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

El aceite esencial que ejerce mayor efecto sobre las bacterias evaluadas es el de "hierba luisa" (88,8%); las dos cepas de *Shigella flexneri* sólo fueron sensibles al sulfametoxazol + trimetropim (20 mm) y a los aceites de "hierba luisa" (HICM de 30 mm) y en menor grado a los de "eucalipto". Los valores de HICM podrían ser indicadores de mayor potencia del aceite esencial de "hierba luisa" sobre esta bacteria causante de la disentería bacilar. Sin embargo, *P. aeruginosa* se muestra resistente.

Tabla 1.- Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de cinco plantas empleadas en Medicina Tradicional en el Perú.

Microorganismos	Aceite esencial (mm)					Controles (mm)				
	A	B	C	D	E	Sxt	Ttr	Pen	Amp	Clr
<i>St. aureus</i> ATCC	6,0 ¹	12,0 ²	9,0 ²	13,0 ²	20,0 ⁴	25,0 ⁷	21,0 ⁷	13,0 ⁶	16,0 ⁵	23,0 ⁷
<i>St. aureus</i> INS	6,0 ¹	15,0 ³	11,0 ²	13,0 ²	23,0 ⁴	23,0 ⁷	20,0 ⁷	13,0 ⁶	17,0 ⁵	25,0 ⁷
<i>Sh. flexneri</i> ATCC	0,0 ¹	0,0 ¹	0,0 ¹	13,0 ²	30,0 ⁴	22,0 ⁷	0,0 ⁵	0,0 ⁵	0,0 ⁵	0,0 ⁵
<i>Sh. flexneri</i> INS	0,0 ¹	0,0 ¹	0,0 ¹	12,0 ²	34,0 ⁴	20,0 ⁷	0,0 ⁵	0,0 ⁵	0,0 ⁵	0,0 ⁵
<i>S. typhi</i> ATCC	14,0 ²	14,0 ²	0,0 ¹	12,0 ²	34,0 ⁴	17,0 ⁷	19,0 ⁷	8,0 ⁵	16,0 ⁵	27,0 ⁷
<i>S. typhimurium</i> ATCC	7,0 ¹	0,0 ¹	0,0 ¹	12,0 ²	30,0 ⁴	27,0 ⁷	15,0 ⁶	0,0 ⁵	0,0 ⁵	27,0 ⁷
<i>S. enteritidis</i> INS	8,0 ¹	0,0 ¹	0,0 ¹	13,0 ²	32,0 ⁴	26,0 ⁷	14,0 ⁵	0,0 ⁵	0,0 ⁵	27,0 ⁷
<i>V. cholerae</i> ATCC	91,0 ⁴	16,0 ³	0,0 ¹	17,0 ³	36,0 ⁴	36,0 ⁷	20,0 ⁷	20,0 ⁶	0,0 ⁵	25,0 ⁷
<i>P. aeruginosa</i> GT	0,0 ¹	0,0 ¹	0,0 ¹	0,0 ¹	8,0 ¹	12,0 ⁵	12,0 ⁵	8,0 ⁵	8,0 ⁵	28,0 ⁷

A: *T. pusilla*,

B: *S. tephrosioides*,

C: *L. meyenii*,

D: *E. globulus*,

E: *C. citratus*.

Valores de sensibilidad en el aromagrama según Duraffourd:

¹ S. nula: ≤8 mm;

² S. límite: 9-14 mm;

³ S. media: 15-19 mm;

⁴ Sumamente sensible: ≥20 mm.

Antibióticos y quimioterápicos (Emerme):

⁵ Resistente;

⁶ Intermedio;

⁷ Sensible.

Sxt: sulfametoxazol + trimetropin; Ttr: tetraciclina; Pen: penicilina; Amp: ampicilina Clr: cloramfenicol.

Las concentraciones de los discos de antibióticos se encuentran en la sección Materiales y Métodos.

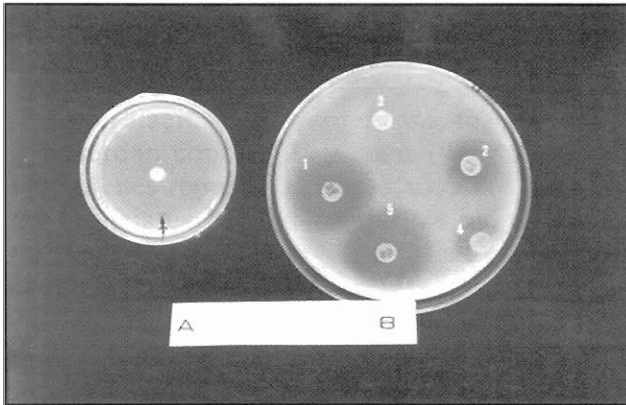


Figura 1.- *Vibrio cholerae* ATCC E-7946 OGAWA frente al aceite esencial de *Tagetes pusilla* “anís serrano”. (A): Aromatograma, halo de inhibición de 91 mm. (B): Antibiograma: 1. Sulfametoxazol, 2. Penicilina, 3. Ampicilina, 4. Tetraciclina, 5. Cloramfenicol.

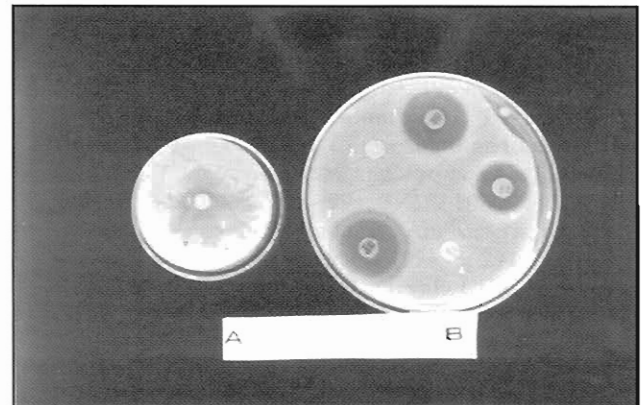


Figura 2.- *Staphylococcus aureus* INS frente al aceite esencial de *Senecio tephrosioides* “humanripa”. (A) Aromatograma: presencia de un halo total (1) y un halo parcial (2). (B) Antibiograma: la cepa es resistente a la penicilina y a la ampicilina. 1. Cloramfenicol, 2. Penicilina, 3. Sulfametoxazol y trimetropin, 4. Ampicilina, 5. Tetraciclina.

Igualmente significativo es el efecto de los aceites de “eucalipto” (88,8%), con la diferencia de que la sensibilidad de las bacterias se encuentra en el límite; sólo *V. cholerae* muestra sensibilidad media.

Los aceites de “humanripa” mostraron efecto moderado sobre el 66,6% de bacterias. Menos efectivos fueron los de “anís serrano” y “sal-

via”, ambos resultaron efectivos sobre 22,2% de las bacterias evaluadas. Se destacó la actividad del aceite de “anís serrano”, que mostró un excelente efecto sobre *V. cholerae*, no sólo superior al de los demás aceites probados, sino también al de los antibióticos tomados como controles de la prueba. Esta evaluación se repitió 6 veces para confirmar el HICM, que fue 91 mm (Figura 1).

Tabla 2. Actividad de los aceites esenciales de cinco plantas empleadas en Medicina Tradicional en el Perú sobre la levadura oportunista *Candida albicans* ATCC 10231.

Microorganismo	Aceite esencial (mm)					Controles (mm)			
	A	B	C	D	E	mic.	esp.	mct.	Oxn
<i>C. albicans</i> ATCC	20,0 ⁴	11,0 ²	0,0 ¹	14,0 ²	21,0 ⁴	0,0 ⁵	0,0 ⁵	27,0 ⁷	0,0 ⁵

A: *T. pusilla*, B: *S. tephrosioides*, C: *L. meyenii*, D: *E. globulus*, E: *C. citratus*.

Valores de sensibilidad en el aromatograma según Duraffourd:

¹ Nula: ≤8 mm; ² Límite: 9-14 mm; ³ Media: 15-19 mm; ⁴ Sumamente sensible: ≥20 mm.

Comportamiento frente a antimicóticos:

⁵ Resistente, ⁶ Intermedio, ⁷ Sensible.

Antimicóticos: mic: micoral esp: esporostatin mct: micostatin oxn: oxonazol

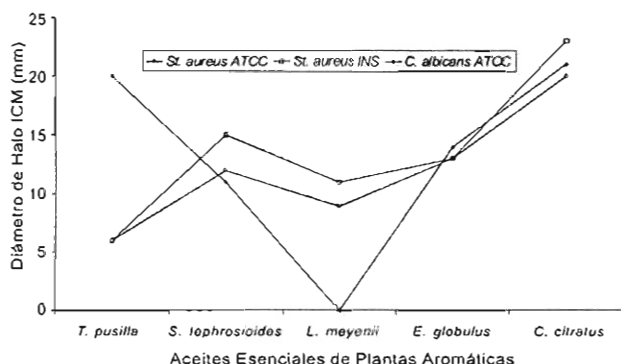


Figura 3.- Perfiles aromáticos de microorganismos Gram positivos.

La “salvia” mostró efecto restringido a las dos cepas de *S. aureus*. En el aromatógrama realizado con el aceite esencial de la “humanripa” frente al cultivo de *S. aureus* INS, se evidenció la presencia de dos HICM, el interno clarificado (que se tomó en cuenta para determinar el efecto) y el externo, con la presencia de colonias que aparentemente son resistentes; además, se obtuvo un halo sinuoso e irregular (Figura 2).

C. albicans resultó muy sensible a los aceites de “anís serrano” y “hierba luisa”, con baja sensibilidad para los aceites de “humanripa” y “eucalipto” y fue resistente a los de “salvia” (Tabla 2).

Las Figuras 3 y 4 muestran los perfiles aromáticos de los microorganismos Gram positivos y Gram negativos evaluados y permiten evidenciar los resultados referidos. Destaca el perfil aromático de *C. citratus*.

DISCUSIÓN

Se confirma la actividad antimicrobiana (que podría ser bactericida o bacteriostática y fungicida o fungistática, dependiendo del caso) de algunos de los aceites aromáticos evaluados, coincidiendo con los reportes realizados por Ahmed (6), Demetzos (7), Singh (8), Saxena (9), Kumar (10), Dellacasa (14), Onawunni (15), Prasad (16), entre otros investigadores.

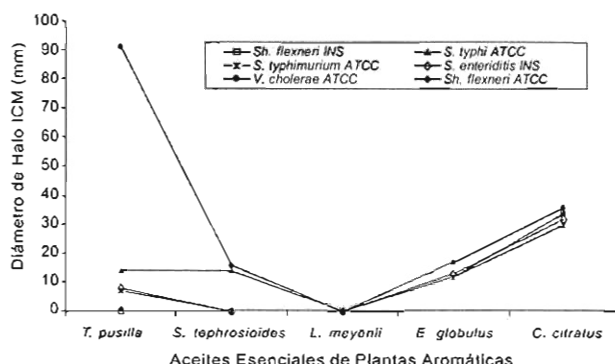


Figura 4.- Perfiles aromáticos de microorganismos Gram negativos.

Los resultados obtenidos permiten validar el uso popular del “anís serrano” y de la “hierba luisa” en el tratamiento de afecciones intestinales, como la salmonelosis y el cólera. El empleo tradicional de la “humanripa”, el “eucalipto”, la “hierba luisa” y la “salvia” en el tratamiento de procesos respiratorios causados por bacterias como *St. aureus* tendría sustento científico. El aceite de “salvia” no mostró actividad sobre ninguna de las bacterias Gram negativas empleadas.

La baja actividad del aceite de “salvia” podría estar relacionada con su naturaleza serosa, a diferencia de los demás que son fluidos. A 45°C el aceite de “salvia” también es fluido, pero los cultivos se realizaron a 37°C, lo cual afectaría su capacidad de difusión en el medio.

Respecto a la levadura oportunista *C. albicans*, resulta interesante que los aceites esenciales de *T. pusilla* “anís serrano” y *C. citratus* “hierba luisa” ejerzan un efecto similar al del micostatín (único antimicótico al que fue sensible). Como un dato adicional es válido informar que el tratamiento tópico de una uña del pie visiblemente afectada por hongos, con gotas de aceite esencial puro de “hierba luisa”, permitió evidenciar su potente efecto, ya que con una sola aplicación se observó remisión del proceso sin ocasionar daño al tejido sano circundante [Dato no publicado]. Este aceite esencial se perfila como una opción en el tratamiento de micosis ocasionadas por esta levadura,

recomendándose los respectivos estudios de toxicidad.

Con relación a *P. aeruginosa*, los resultados concuerdan con los de Kumar (10) y Dellacasa (14) quienes reportaron su resistencia a los aceites esenciales de "eucalipto", ninguno de los otros cuatro aceites tuvieron efecto sobre esta bacteria que resultó ser la más resistente de todas las evaluadas.

Se hace necesario realizar los respectivos bioensayos ya que los aceites esenciales se presentan como prometedores medicamentos alternativos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Superior de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por financiar la presente investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Fahn A. Anatomía Vegetal. H. Madrid, España: Blume Ediciones. 1978.
- 2) Strasburger E, Noll E, Schenk H, Schimper Y. Tratado de Botánica. 7ª edición. Barcelona, España: Ediciones Marín. 1978.
- 3) Duraffourd C, Dhervocourt L, Lapraz JC. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1ª edición. Barcelona, España: Edit. Masson S.A. 1986.
- 4) Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. 1988.
- 5) Boatto G, Pintore G, Palomba M, De Simone F, Ramundo E, Todice G. Composition and antibacterial activity of *Inula helenium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Fitoterapia* 1994; 3: 279-80.
- 6) Ahmed S, Kapadia Z, Badar Y. Antibacterial activity of *Salvia santolinifolia*. *Fitoterapia* 1994; 3: 271-2.
- 7) Demetzos CN, Chinou JB, Charvala CE. The essential oil of *Cistus parviflorus* and its antimicrobial activity comparison with *C. mospeliensis*. *Fitoterapia* 1990; 5: 439-42.
- 8) Singh SP, Neg S, Larmi L, Singh AK. Antimicrobial properties of essential oils from *Zingiber chrysanthum* leaves and rhizomes. *Fitoterapia* 1992; 1: 73-5.
- 9) Saxena VK, Jain SK. *Thevetia peruviana* Kernel oil: a potential bactericidal agent. *Fitoterapia* 1990; 4: 348-9.
- 10) Kumar A, Sharma V, Singh AK. Antibacterial properties of different *Eucalyptus* oils. *Fitoterapia* 198; 2: 141-4.
- 11) Cabrera AL. Flora de la provincia de Jujui, República Argentina. Parte X Compositae. Buenos Aires, Argentina: Colección Científica del INTA. 1978.
- 12) Ferreyra R. Fanerógamas, Gymnospermas y Angiospermas (con especial referencia a la flora peruana) Lima, Perú. 1971.
- 13) Ferreyra R. Flora del Perú. Dicotiledóneas (Sinopsis de la Flora Peruana). Lima, Perú. 1975.
- 14) Dellacassa E, Menendez P, Moyna P, Cerdeiras P. Antimicrobial activity of *Eucalyptus* essential oils. *Fitoterapia* 1989; 6: 544-6.
- 15) Onawunni GO, Yisak WA, Ogunlana EO. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* D.C. *Staf. J Ethnopharmacol* 1984; 12: 279-86.
- 16) Prasad G, Kumar A, Singh AK, Nhattacharya AK, Singh K, Scharma VD. Antimicrobial activity of essential oils some *Ocimum* species and clove oil. *Fitoterapia* 1986; 6: 429-32.