



FORMANDO
PROFESIONALES
DE
LA QUÍMICA

"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE ORÉGANO (*Origanum spp.*) EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS Y POSITIVAS

Gallegos Flores Perla^{1,2}, Delgadillo Ruiz Lucia¹, Esparza Ibarra Edgar¹ y
Bañuelos Valenzuela Rómulo².

Unidad Académica de Ciencias Biológicas-UAZ¹
Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UAZ²

RESUMEN

Las plantas aromáticas, son consideradas de gran interés por la gran cantidad de compuestos bioactivos presentes en ellas. Los extractos de plantas tienen una fuerte actividad antimicrobiana, ya que inhiben el crecimiento y supervivencia de microorganismos tanto bacterias, protozoos y hongos. El objetivo fue evaluar la actividad antibacteriana de extractos de orégano en bacterias gram negativas y positivas. Metodología: Recolección de la planta de orégano (*Origanum spp.*), preparación de los extractos, caracterización química por cromatografía de gases y evaluación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco. Los principios activos presentes en mayor concentración fueron el terpineno con 15,700 mg/mL en el extracto alcohólico, seguido por el carvacrol (165 mg/mL) y timol (24 mg/mL) para el extracto oleoso. El extracto de orégano con mayor actividad antibacteriana frente a las bacterias evaluadas (*Escherichia coli*, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus spp.*) fue el oleoso, ya que es el extracto que tiene la mayor concentración de los principios activos. Los extractos acuosos (cocción e infusión) tienen halos de inhibición nulos, por lo que no inhiben el crecimiento de las bacterias. Se encontró que la acción biológica de los extractos, depende de la composición química y concentración de principios activos, así como el método de preparación de los mismos. Los extractos de orégano oleosos, podrían ser utilizados como alternativa en medicina para nuevas fuentes terapéuticas contra las bacterias resistentes a los antibióticos.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido utilizadas como una alternativa en medicina tradicional alrededor del mundo por milenios. Las plantas aromáticas, son consideradas de gran interés por sus propiedades organolépticas, químicas y medicinales, debido a la gran cantidad de compuestos bioactivos presentes, los cuales tienen grandes beneficios nutracéuticos y son ampliamente utilizados como



FORMANDO
PROFESIONALES
DE LA QUÍMICA

"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"



FECHAS
29 al 31 de Agosto 2017

tratamiento para enfermedades de la piel, digestivas, respiratorias, entre otras, además con fines antivirales y antimicrobianos¹, aprovechando este último efecto muchos de los antibióticos actualmente utilizados para tratar infecciones bacterianas fueron aislados a partir de plantas aromáticas², los cuales proporcionan nuevas fuentes terapéuticas contra las bacterias resistentes a los antibióticos.

Estudios muestran que las plantas aromáticas de la familia Lamiaceae tienen efecto antioxidante y antibacterial, esto atribuido a la gran cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides presentes en las planta³. Dentro de esta familia, el orégano (*Origanum spp.*), es probablemente una de las plantas más usada cuyos extractos y aceites son particularmente ricos en monoterpenos fenólicos principalmente carvacrol y timol⁴.

Los extractos de plantas son compuestos lipofílicos aromáticos con una fuerte actividad antimicrobiana, que inhiben el crecimiento y la supervivencia de una serie de microorganismos tanto para bacterias, protozoos y hongos⁵. Químicamente los extractos son una mezcla de varios compuestos, principalmente de compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides. El extracto de orégano tiene una alta capacidad antioxidante cuando se compara con otras hierbas medicinales⁶. Los principales constituyentes químicos del orégano, son el carvacrol, timol, α -terpineno, limoneno y linalol dependiendo del origen y tipo de planta, estos compuestos poseen efectos antimicrobianos y antioxidantes⁷.

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de orégano; por lo que se ha documentado que el aceite esencial de la especie del género *Origanum* presenta actividad contra bacterias gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*, pero no contra *Pseudomona aeruginosa*⁸. Tienen además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C.tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*⁹.

METODOLOGÍA

Recolección de la planta de orégano

La planta de orégano, se recolectó en el mes de septiembre 2014 en el municipio de Valparaíso, Zacatecas, México, la cual se dejó secar a temperatura ambiente durante 2 semanas después del corte. Se deshidrató a 45 °C en un horno Thermo Scientific ® durante 24 h.



FORMANDO
PROFESIONALES
DE LA QUÍMICA

"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"



Preparación de los extractos

La preparación de los extractos fue a partir de una mezcla de hojas, flores y tallos de la planta deshidratada y triturada. Los extractos fueron preparados en tres medios diferentes; acuosos, alcohólicos y oleosos.

+Extracto Acuoso

Para un medio acuoso se obtuvieron dos preparaciones: Cocción e Infusión. Se usó una relación de 25 g de muestra molida de orégano por cada 200 mL de agua destilada. Para la cocción, se hirvió la planta deshidratada en agua durante 30 min., se dejó reposar 10 min. En la preparación de infusión, se hirvió el agua durante 5 min., posteriormente se añadió la muestra de orégano y se dejó reposar durante 10 min., para ambos extractos se filtró a través de papel de filtro (Whatman no. 4) y se almacenó en frascos ámbar^{10,11}.

+Extracto Alcohólico

La extracción alcohólica, se realizó utilizando una relación de 25 g de muestra molida por cada 200 mL de etanol:agua (80:20, v/v), la mezcla se colocó en frascos ámbar y se dejó macerar durante un mes con agitación cada tercer día, se filtró a través de papel de filtro (Whatman no. 4) y finalmente, el 70% del volumen total del solvente se vaporizó en un extractor tipo Soxhlet a 85°C¹².

+Extracto Oleoso

El extracto oleoso, se obtuvo a partir de la muestra seca por hidrodestilación durante una hora utilizando un sistema Clevenger modificado¹¹.

Determinación de principios activos en los extractos

La composición química de los principios activos, se determinó mediante cromatografía de gases (CG) en un equipo Agilent Technologies serie 6890N, empleando una columna polar DB_WAXetr con las siguientes características: largo 50 m, ancho 320 µm, ancho de poro 1 µm. La identidad de cada compuesto fue asignado por comparación de su tiempo de retención con respecto a una mezcla estándar. Para los propósitos de cuantificación se utilizó el área de los picos normalizados para cada estándar. Los estándares utilizados fueron: carvacrol, limoneno, linalol, terpineno y timol, con una pureza de 98, 98, 97, 85 y 99.5 % respectivamente, los cinco estándares son de la marca sigma Aldrich.

Aislamiento de bacterias gram positivas y negativas

Los microorganismos bacterianos utilizados fueron bacterias gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomona spp*, *Clostridium spp* y *Salmonella spp*. y bacterias



FORMANDO
PROFESIONALES
DE LA QUÍMICA

"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"



JORNADAS DE CIENCIAS
QUÍMICAS
FECHAS
29 al 31 de Agosto 2017

gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus spp.* Las cuáles fueron identificadas por pruebas bioquímicas en el equipo Phoenix 100 Becton Dickinson and Company ® Sparks, Maryland 21152 USA. Las condiciones de crecimiento para cada bacteria fue una temperatura de 37 °C en una incubadora Thermo ® por un periodo de 24 h.

Actividad antibacteriana por el Método de difusión en disco

Se determinó utilizando el método de difusión en disco de papel (NCCLS, 2002). Las suspensiones bacterianas se ajustaron a una concentración de 1×10^7 UFC mL⁻¹ (0.5 ° McFarland) y se extendieron 300 µL de la suspensión bacteriana en la placa de agar Mueller-HintonI. Posteriormente, se colocaron en la superficie de cajas de Petri, discos de papel de filtro (7 mm de diámetro; Whatman No. 1) y se impregnaron con 20 µL de cada uno de los extractos. Como control negativo se utilizó agua estéril y etanol ya que son los mismos disolventes en los que se encuentran los extractos acuosos y alcohólico. Se utilizaron dos antibióticos (ceftibuten y cefalexina) a una concentración de 36 mg/mL. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Interpretación de Resultados

La actividad antibacteriana se evaluó midiendo el radio de las zonas de inhibición al milímetro más cercano del papel filtro. Los resultados cualitativos de la actividad antimicrobiana, se convirtieron en una escala semicuantitativa¹⁰ que se clasifica de acuerdo al halo de inhibición como:

(-) Ausencia de halo; 0 mm; (+) Halo débil; 1 a 6 mm; (++) Halo moderado; 7 a 14 mm; (+++) Halo fuerte; superior a 15 mm.

RESULTADOS

Rendimiento de los diferentes extractos de orégano.

A partir de las mezcla de hojas, flores y tallos de orégano, se obtuvieron los siguientes rendimientos mostrados en la tabla 1. En esta tabla el mayor rendimiento (relación peso/volumen) se presentó en los extractos acuosos; cocción e infusión con un 75 % y 87 % respectivamente. Pesewu y colaboradores (2008), reportaron que los rendimientos para extractos alcohólicos se encuentra entre un 3.2 y 16% y para los extractos acuosos reportaron un rendimiento de 2.6 a 16.4%¹². Para el extracto oleoso, Aligiannis y colaboradores (2001), reportaron rendimientos para la planta del genero *Origanum* de 0.6% usando un aparato tipo

FORMANDO
PROFESIONALES
DE
LA QUÍMICA"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"FECHAS
29 al 31 de Agosto 2017

Clevenger modificado por 3 hr¹³. Los resultados de la tabla 1, muestran rendimientos superiores a los reportados por estos autores.

Tabla I. Rendimiento de extractos de orégano.

Extracto de orégano	Peso (g)	Solvente (mL)	Vol. extracto (mL)	% Rendimiento (w/w)
Cocción	250	2000	1500	75
Infusión	250	2000	1750	87.5
Alcohólico	250	2000	673	33.6
Oleoso	250	----	6.5	2.5

Determinación de principios activos en los extractos.

La acción biológica de los extractos de orégano, dependen de la composición química y concentración de principios activos, el tipo de planta y su lugar de origen así como el método de preparación de los mismos¹⁴. En la tabla 2, se puede apreciar que de acuerdo al método de extracción, la presencia de los principios activos difiere para cada extracto además de tener concentraciones diferentes. Se observó que la infusión fue el método en el que se extrajo la menor cantidad de los principios activos señalados, sin embargo, la concentración de limoneno fue mayor en la infusión que en el resto de las preparaciones.

Estudios previos han reportado que los mayores componentes en los extractos de orégano son el carvacrol y su isómero timol, seguido de su precursor el α -terpinene^{4,15,16,17}. La tabla 2, muestra que el carvacrol fue dominante en los extractos oleosos seguido del extracto alcohólico, sin embargo no existe presencia de este compuesto en los extractos acuosos, esto deja en claro una vez más que de acuerdo al medio de extracción se obtendrán diferentes compuestos bioactivos así como diferentes concentraciones. Los principios activos con mayor concentración fueron el α -terpinene (15,700 mg/mL) y linalol (14,700 mg/mL) en los extractos alcohólico y aceite de orégano[®] respectivamente.

Tabla II. Concentración y composición química de los extractos de orégano.

Extracto	α -Terpinene (mg/mL)	Limoneno (mg/mL)	Linalol (mg/mL)	Timol (mg/mL)	Carvacrol (mg/mL)
Cocción	71.74	0.00	1.82	4.89	0.00
Infusión	0.0	65.98	0.00	8.74	0.00
Alcohólico	15,700	0.00	10.54	26.71	3.23
Oleoso	0.00	14.49	8.78	24.74	165.20
Aceite de Orégano [®]	0.00	32.06	14,700	116.98	282.67

FORMANDO
PROFESIONALES
DE LA QUÍMICA"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"JORNADAS DE CIENCIAS
QUÍMICAS
FECHAS
29 al 31 de Agosto 2017

Actividad antimicrobiana

En la tabla 3, se describen los halos de inhibición en milímetros y en escala semicuantitativa, donde se puede observar que el extracto de infusión fue el que menor actividad presentó frente a cada una de las bacterias, esto puede estar influenciado a la composición y concentración de los principios activos (tabla 2) ya que fue el que menos compuestos presentó. El extracto alcohólico presentó un halo de inhibición débil, donde la bacteria más susceptible a este extracto fue *E. coli*. El extracto de orégano con mayor actividad frente a cada una de las bacterias evaluadas son los oleosos, ya que son los extractos que tienen la mayor concentración de los principios activos carvacrol y timol (tabla 2), a los cuales se les atribuye su efecto antibacteriano. El aceite de orégano® presentó halos de inhibición tanto débiles, moderados y fuertes, tiene un mayor efecto para las bacterias *E. coli* y *Salmonella spp.* El aceite de orégano®, tiene efecto similar a los antibióticos. Las bacterias más resistentes frente a cada uno de los extractos fueron *Pseudomona spp.* y *Clostridium spp.*

Tabla III. Actividad antibacteriana.

Extracto	Bacterias											
	<i>E. coli</i>		<i>Pseudomona spp.</i>		<i>Salmonella spp.</i>		<i>Clostridium spp.</i>		<i>S. aureus</i>		<i>Streptococcus spp.</i>	
	+/-	mm	+/-	mm	+/-	mm	+/-	mm	+/-	mm	+/-	mm
Agua	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
-OH 80%	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
Cocción	+	1	+	1	-	0	-	0	-	0	+	1
Infusión	-	0	-	0	+	2	-	0	-	0	+	2
Alcohólico	+	6	+	1.5	-	0	+	2	-	0	+	4.5
Oleoso	++	7	+	2	+	2.25	+	1	++	6.5	++	10
A. Oregano®	+++	> 20	+	2.5	+++	> 20	+	3.5	++	11.5	+++	17
Cedax (36 mg/mL)	++	14	++	10	+++	20	-	0	+++	16	+	6
Cefalexina (36 mg/mL)	++	12	+	1	++	11	+++	15	+++	16	+++	15

El aceite de orégano afecta la composición de mureína, en bacterias gram negativas y por lo tanto afecta su pared celular; provocando susceptibilidad de estas bacterias frente a este extracto^{9,18}. Se ha descrito que los aceites de plantas ricos en compuestos fenólicos como el carvacrol y timol poseen altos niveles de actividad antibacteriana^{9,19}. Dorman y Deans (2000) investigaron el efecto de muchos terpenoides frente a 25 cepas bacterianas diferentes entre ellas están el *Clostridium spp*, *Escherichia coli spp*, *Pseudomona spp*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus spp* y mostraron que todos los compuestos terpenoides, excepto el borneol exhibían una amplia actividad antimicrobiana²⁰. Estos resultados confirman la alta actividad antimicrobiana de estos dos compuestos,



UAZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
ZACATECAS
"Francisco García Salinas"

UACQ



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS

FORMANDO
PROFESIONALES
DE
LA QUÍMICA"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"

donde su efecto está relacionado a sus estructuras químicas y a los grupos funcionales presentes.

CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que las plantas medicinales especialmente la planta de orégano, posee propiedades antibacterianas que apoyan su valor en la fitoterapia para el tratamiento de enfermedades bacterianas, así como una alternativa para ser utilizado como alternativa para desarrollar nuevas fuentes terapéuticas contra las bacterias resistentes a los antibióticos.



FORMANDO
PROFESIONALES
DE
LA QUÍMICA

"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"



JORNADAS DE CIENCIAS
QUÍMICAS
FECHAS
29 al 31 de Agosto 2017

REFERENCIAS

1. Gonzáles, M. R. et al. (2008). *Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia*. Journal of Ethnopharmacology, 116 (2): 341-357.
2. Coe, F. G. y Anderson, G. J. (1996). *Screening of medicinal plants used by Garifuna of Eastern Nicaragua for bioactive compounds*. Journal of Ethnopharmacology, 53: 329-50.
3. Armatu, A. et al. (2010). *Evaluation of antioxidant and free scavenging potential of some Limiaceae species growing in Romania*. Romanian Biotechnological Letters, 15 (3): 5274-5280.
4. Béjaoui, A. et al. (2013). *Essential oil composition and antibacterial activity of Origanum vulgare subsp. Glandulosum Desf. at Different phenological stages*. Journal of Medicinal Food, 16 (12): 1115-1120.
5. Benchaar, C. et al. (2008). *A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production*. Animal Feed Science and Technology, 145: 209–228.
6. Matsuura, H. (2003). *DPPH radical scavengers from dried leaves of oregano (Origanum vulgare)*, 67: 2311–2316.
7. Baser, K. H. (2002). *Oregano: The Genera Origanum and Lippia*. p. 109-126 En S. E. Kintzios. Editorial, *The Turkish Origanum species*. London, UK and New York, NY.
8. Elgayyar M. et al. (2001). *Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms*. J. Food Protect; 64 (7): 1019-1024.
9. Sivropoulou A. (1996). *Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils*. J. Agric. Food Chem; 44: 1202-1205.
10. Martins, N. et al. (2014). *Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of Origanum vulgare L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds*. Food Chemistry, 158: 73–80.
11. Teixeira, B. (2013). *Chemical composition and bioactivity of different oregano (Origanum vulgare) extracts and essential oil*. Journal of Science of Food and Agriculture, 93 (11): 2707–2714.
12. Pesewua, G. et al. (2008). *Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA*. Journal of Ethnopharmacology, 116: 102–111.
13. Aligiannis N. et al. (2001). *Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species*. J. Agric. Food Chem.; 49: 4168-4170.



UAZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
ZACATECAS
"Francisco García Salinas"

UACQ



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS

FORMANDO
PROFESIONALES
DE
LA QUÍMICA"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"FECHAS
29 al 31 de Agosto 2017

14. Vokou, D., Kokkini, S. y Bessiere, J. (1993). *Geographic variation of Greek oregano (Origanum vulgare ssp. hirtum) essential oils*. B. Systematics and Ecology, 21: 287–295.
15. Aridogan, B. (2002). *Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils*. Arch. Pharmacological Reserch, 26 (6): 860-864.
16. Kokkini, S. et al. (2004). *Essential oil composition of Greek (Origanum vulgare spp. hirtum) and Turkish (O. onites) oregano: A tool for their distinction*. J Essential Oil Research, 16(4): 334-338.
17. Burt, S. (2004). *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review*. Journal Food and Microbiology, 94: 223-253.
18. Caillet S, Shareck F and Lacroix M. (2005). *Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of Escherichia coli O157:H7*. J Food Prot 68:2571–2579.
19. Panizi, L. et al. (1993). *Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae*. J. Ethnopharmacol, 39, 167-170.
20. Dorman H y Deans S. (2000). *Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils*. Journal of Applied Microbiology. 88, 308–316.