

Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino

Antimicrobial action of *Origanum vulgare* L. essential oil against bacteria isolated from bovine milk

Dra. Marta Elaine Bastos Oyarzabal,¹ Dr. Luiz Filipe Damé Schuch,¹ Dra. Luciana de Souza Prestes,¹ Lic. Diane Bender Almeida Schiavon,¹ Lic. Maria Regina Alves Rodrigues,¹ Dr. João Roberto Braga de Mello¹

¹ Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul. Brasil.

RESUMEN

Introducción: la mastitis bovina es el mayor problema en la producción lechera, causada principalmente por bacterias grampositivas. La búsqueda de principios activos que actúen en esos microorganismos es creciente, sobre todo por la ocurrencia de multirresistencia bacteriana.

Objetivos: evaluar la concentración bactericida mínima del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) frente a bacterias aisladas de leche mastítica.

Métodos: se evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *O. vulgare* frente a 71 bacterias aisladas de leche bovina, de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium*; y 3 cepas patrón de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. La técnica utilizada fue de dilución en microplaca.

Resultados: la concentración bactericida mínima media varió de 0,23 a 2 % frente a las bacterias aisladas de leche bovina, con la menor concentración para el género *Streptococcus* y la mayor para *Staphylococcus* coagulasa negativa. En cuanto a las cepas patrones la concentración bactericida mínima fue de 3,17 y 0,35 % para *S. aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente; no presentó efecto para *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusiones: en los resultados se comprobó la actividad *in vitro* del aceite de orégano frente a las bacterias relacionadas con la mastitis bovina.

Palabras clave: *Origanum vulgare*, mastitis, antimicrobiano.

ABSTRACT

Introduction: bovine mastitis is a major problem in dairy production, mainly caused by Gram-positive bacteria. The search for active ingredients that act upon these microorganisms is growing due to occurrence of bacterial multiresistance.

Objectives: to assess the minimum bactericidal concentration (MBC) of *Origanum vulgare* L. (oregano) essential oil against bacteria isolated from mastitic milk.

Methods: the antimicrobial activity of *O. vulgare* essential oil was measured against 71 bacteria from the genera *Streptococcus*, *Staphylococcus* and *Corynebacterium* isolated from the bovine milk and against three pattern strains, that is, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The technique was dilution in microplate.

Results: the mean minimal bactericidal concentration (MBC) ranged from 0.23 % to 2 % against the bacteria isolated from bovine milk, with the lowest concentration for *Streptococcus* genus and the highest for coagulase-negative *Staphylococcus*.

Regarding the pattern strains, the MBC was 3.17 % and 0.35 % for *S. aureus* and *Escherichia coli* respectively and showed no effect for *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusions: the results confirmed the *in vitro* activity of *Origanum vulgare* L. oil against the bovine mastitis-related bacteria.

Key words: *Origanum vulgare*, mastitis, antimicrobial.

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es causada principalmente por agentes bacterianos, de los cuales son más frecuentes los que pertenecen a los géneros: *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Corynebacterium*. Bacterias gramnegativas, como *Escherichia coli* y *Pseudomonas* spp., también causan mastitis, pero con menos frecuencia.¹ Además de causar perjuicios por la reducción de la calidad y cantidad de leche, la mastitis puede aumentar el riesgo de la presencia de residuos antimicrobianos, por el uso de antibióticos en el tratamiento de la mastitis clínica.^{2,3}

La búsqueda de nuevos principios activos que actúen en los principales microorganismos causantes de enfermedades, tanto en el hombre como en animales, es creciente.⁴ Los productos naturales pueden ser tan eficientes como los producidos por la síntesis química. Diversos condimentos como ajo, orégano, tomillo y muchos otros, han demostrado actividad antimicrobiana, lo que explica su utilización histórica.^{5,6}

Origanum vulgare L. (orégano) es una planta perenne, perteneciente a la familia Lamiaceae. Originario de la región del Mediterráneo, también cultivado en Europa, Asia y Taiwan y en América del Sur. Su principal productor es Chile, pero también es producido en Bolivia, Perú, y en menor escala, en Argentina y Uruguay. El orégano presenta como componente principal un aceite esencial, con más de 34 compuestos activos, de los cuales los fenoles como carvacrol, timol, α -terpeno y p-cimeno pueden alcanzar entre 80,2 y 98 % de la composición del aceite.⁷⁻⁹

Existen muchos estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano, que son indicados como bactericidas e insecticidas, los

cuales presentan actividad antimicrobiana comparable, o incluso mayor, que los compuestos típicamente utilizados para estos propósitos.¹⁰

El objetivo del trabajo consistió en evaluar la concentración bactericida mínima (CBM) del aceite esencial de orégano frente a bacterias de origen de leche mastítica y cepas patrones.

MÉTODOS

Aceite esencial de orégano

Las muestras de orégano (*O. vulgare*) de origen peruano fueron adquiridas de la distribuidora comercial. Para la obtención del aceite la planta fue sometida a extracción por hidrodestilación en aparato de *Clevenger*, según la Farmacopea Brasileña (1988).¹¹ El análisis del aceite esencial fue realizado por cromatografía gaseosa con detector de ionización por llama (CG/DIC). La extracción y el análisis se realizaron en el Laboratorio de Fitoquímica de la UFPel. Los demás exámenes fueron realizados en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Federal de Pelotas (UFPel).

Aislados bacterianos

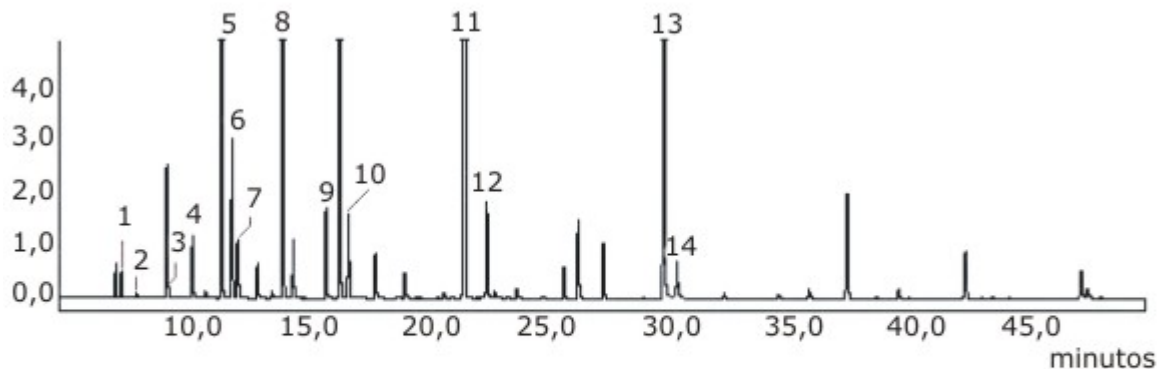
Las bacterias utilizadas fueron de los géneros *Streptococcus* (18), *Staphylococcus* (36) y *Corynebacterium* (17), aisladas de leche bovina con diagnóstico de mastitis clínica o subclínica y cepas de referencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) y *Escherichia coli* (ATCC 8739). Para la obtención de los aislados, las muestras de leche se sembraron en agar sangre ovino y se incubaron en estufa a 36 °C por 48 h, se caracterizaron por el método de coloración de Gram y pruebas bioquímicas.¹² Las muestras patrones se obtuvieron de la Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Actividad antimicrobiana

Para determinar la concentración bactericida mínima (CBM) del aceite esencial de orégano frente a las cepas bacterianas, se utilizó el método de microdilución en caldo, de acuerdo con lo descrito en el documento CLSI M7-A6 (2005) adaptado para fitoterapeutas.¹³ Los microorganismos fueron activados a través de cultivo en caldo BHI a 37 °C, en agitación por 24 h. Posteriormente, se ajustaron en escala 2 de *Mac Farland* y se diluyeron en medio *Muller-Hinton*, para alcanzar la concentración bacteriana final de 10⁵-10⁶ UFC/mL. El aceite de *O. vulgare* se diluyó en base logarítmica 2, alcanzando las concentraciones de 16 y 0,063 %. El experimento se realizó en triplicado y las diluciones en agua con *Tween* 20 a 1 %, así como se realizaron controles de crecimiento bacteriano (inóculo/medio) y de esterilidad del aceite (aceite esencial/medio). Las microplacas se incubaron a 36 °C por 48 h en agitación a 100 rpm. A continuación 5 µL de cada cultivo se replicó en placas de agar sangre que quedaron en estufa a 36 °C por 24 h. La CBM se determinó por la menor concentración del aceite donde no hubo crecimiento bacteriano en las placas de agar sangre.

RESULTADOS

En relación con los compuestos detectados por el análisis cromatográfico de la muestra de orégano utilizada, se observó mayor concentración de α -terpineno, 4-terpineol, timol y baja concentración de carvacrol. Otros 2 picos aparecen en el análisis cromatográfico, el primero aproximadamente a los 14 min de retención, tiempo esperado para el λ -terpineno y, el segundo, a los 17 min, tiempo esperado para el cis-sabineno-hidratado (Fig.).



Picos de los patrones: 1: α -pineno, 2: canfeno, 3: β -pineno, 4: mirceno, 5: α -terpineno, 6: *p*-cimeno, 7: limoneno, 8: 1,8-cineol, 9: terpinoleno, 10: linalol, 11: 4-terpineol, 12: β -terpineol, 13: timol, 14: carvacrol.

Fig. Cromatografía del aceite esencial de orégano obtenido por hidrodestilación en Clevenger.

En este trabajo se evaluaron las diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano frente a 71 bacterias aisladas de leche, con resultado positivo al *California mastitis test* (CMT) y 3 cepas patrones. La CBM media varió de 0,23 a 2 % frente a las bacterias aisladas de leche, la menor concentración resultó para el género *Streptococcus* y la mayor para *Staphylococcus coagulasa* negativa (tabla). En relación con las cepas patrones, la CBM resultó de 3,17 y 0,35 % para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente; no presentó efecto para *Pseudomonas aeruginosas* en las concentraciones examinadas.

Tabla. Concentración bactericida mínima (CBM) —media, máxima y mínima— del aceite de orégano ante microorganismos aislados de leche bovina

Microorganismos	N	CBM %	
		Media	Mínima-Máxima
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	1	3,17	-
<i>Staphylococcus intermedius</i>	9	1,55	1,0-2,52
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	0,65	0,31-1,26
<i>Staphylococcus coagulasa</i> positivo	8	1,53	0,5-8,0
<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo	6	2,00	0,5-5,04
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6	0,93	0,16-2,52
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	6	0,42	0,13-1,26
<i>Streptococcus uberis</i>	3	0,68	0,31-2,00
<i>Streptococcus</i> sp.	3	0,23	0,13-0,63
<i>Corynebacterium</i> sp.	17	0,60	0,4-1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	1	>16,00	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC	1	0,35	-

DISCUSIÓN

La acción antimicrobiana del aceite de orégano ha sido objeto de investigación que justifica su uso popular en la preparación, conservación de alimentos y como medicinal. La variación de sus constituyentes tiene interferencia en esa actividad.¹⁴ Se clasificaron muestras indianas analizadas por ellos y las compararon con la de otros autores, basado en los componentes en mayor cantidad, determinando quimiotipos. Utilizando esta misma clasificación, se puede definir que el aceite utilizado en ese trabajo posee timol y terpenos en cantidad semejante. En muestras adquiridas en el mercado brasileño, se puede demostrar la presencia de grandes variaciones de constitución, incluso muy semejantes a las encontradas en el presente trabajo.¹⁵

Otros autores evaluaron actividad antibacteriana del aceite esencial de *O. vulgare*, donde comprobaron su efecto antimicrobiano frente a bacterias grampositivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias gramnegativas.¹⁶ La acción de extracto sobre *Pseudomonas aeruginosa* ya fue demostrada con concentración de inhibición mínima (CIM) del aceite de orégano de 12 %. La CBM fue mayor para la cepa patrón de *Staphylococcus aureus* que para los aislados de campo, con resultado semejante al citado por otros autores.¹⁷

El aceite de orégano resultó más eficaz para *Escherichia coli* con 0,35 % de CBM.¹⁸ Se encontró a través de la técnica de difusión en agar un halo de inhibición de $29,5 \pm 3,4$ mm, considerándose el halo de inhibición a partir de 4 mm.

Rehder y otros¹⁹ estudiaron el aceite esencial de 2 especies de *Origanum* (*O. applii* y *O. vulgare*) que presentaron actividad contra las bacterias *Salmonella choleraesuis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecium*.

O. vulgare demostró actividad *in vitro* frente a las bacterias grampositivas y gramnegativas, con CBM menor para *Streptococcus* sp., lo que justifica nuevos análisis con aceite de orégano en exámenes *in vivo*.

AGRADECIMIENTO

Al apoyo de CAPES para la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ladeira SRL. Mastite Bovina. In: Riet-Correa FA, Schild AL, Méndez, MC. Doenças de ruminantes e equinos. Pelotas: Universitária/UFPel, 1998:248-60.
2. Santos MV. Impacto econômico da mastite bovina. A Hora Veterinária. 2003;22: 46-50.
3. Costa EO, Raia RB, Garino Jr.F, Watanabe ET, Ribeiro AR, Groff MR. Presença de resíduos de antibióticos no leite de pequena mistura de propriedades leiteiras. NAPGAMA. 1999;2: 10-3.
4. Duarte MCT. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais [Obtido 2007 Oct 04]. Disponível em: http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf
5. Miguel MD, Miguel GO. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Robe; 1999.
6. Bedin C, Wald V B, Wiest J M. Atividade antibacteriana in vitro do decocto de *Origanum applii* (Domin.) Boros - Labiatae (orégano, manjerona) sobre agentes de interesse em alimentos. Arq Faculd Vet UFRGS.1998;26: 113-5.
7. Albado PE, Saez FG, Gabriel AS. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Rev Med Hered. 2001;12: 16-9.
8. Rodrigues MRA. Estudo dos Óleos Essenciais Presentes em Manjerona e Orégano. 2002. 143f [Tese de Doutorado em Química]. Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2002.
9. Castro LO, Chemale VM. Plantas medicinais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo. Guaíba: Agropecuária; 1995.
10. Arcila-Lozano CC, Loarca-Piña G, Lecona-Urbe S, Mejía EG. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN). 2004;54.
11. Farmacopéia Brasileira. v.1. 4º ed. São Paulo: Atheneu; 1988.
12. Quinn PJ, Cartes ME, Markey B, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. Londres: Wolfe; 1998. p. 648.

13. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically: Approved Standard. M7-A6; 2005.
14. Verma RS, Padalia RC, Chauhan A, Verma RK, Yudav AK, Singh HP. Chemical diversity in indian orégano (*Origanum vulgare* L.). Chemistry Biodiversity. 2010;7:2054-64.
15. Oliveira DH, Farias AM, Cleff MB, Meireles MCA, Rodrigues MRA. Caracterização química do óleo essencial de *Origanum vulgare*: Análise da relação timol/carvacrol. Pelotas/Brasil: XVII CIC; 2008.
16. De Martino L, De Feo V, Formisano C, Mignola E, Senatore F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Letswaart growing wild in Campania (Southern Italy). Molecules. 2009;14:2735-46.
17. Prestes LS, Frascolla R, Santin R, Dos Santos MAS, Schramm RC, Rodrigues MRA, et al. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. Rev Cubana Plant Med. 2008;13(4) [citado 08 Oct 2010]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400003&lng=es&nrm=iso
18. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil. J Applied Microbiol. 2000;83:308-16
19. Rehder VLG, Machado ALM, Delarmelina C, Sartoratto A, Figueira GM, Duarte MCT. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. Rev Brasileira Plant Med. 2004;6:67-71.

Recibido: 15 de noviembre de 2010.

Aprobado: 20 de enero de 2011.

Marta Elaine Bastos Oyarzabal. Laboratório de Doenças Infecciosas, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul. Brasil. CEP 96048000. Correo electrónico: marta_oyarzabal@yahoo.com.br