

EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE *Rosmarinus officinalis* EN CEPAS DEL TRACTO DIGESTIVO.

Clave de registro:

CIN2012A10227

Escuela de Procedencia:

Centro Universitario México. CUM

Autores:

Aguilar Velazquez Mario Alejandro.

Tovar Giombini Diego Alexei.

Saenz Burrola Ariel Andres.

Asesor:

Biol. Ivonne Herrera Reyes.

Área de Conocimiento:

Ciencias Biológicas, Químicas y de la Salud

Disciplina:

Ciencias de la Salud

Tipo de Investigación:

Experimental

México D.F., a 12 de febrero de 2013.



EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE *Rosmarinus officinalis* EN CEPAS DEL TRACTO DIGESTIVO.

RESUMEN

El empleo de numerosos fármacos así como la automedicación y la no conclusión de los tratamientos recetados ha hecho que numerosas cepas bacterianas se seleccionen resistentes a los fármacos convencionales. Es por eso que en esta investigación probamos la eficacia de la medicina tradicional mexicana en cepas bacterianas de: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Citrobacter rodentium* y *Candida albicans*. Para ello se extrajo el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* evaluando su actividad antimicrobiana. Se utilizaron 50 cajas con agar Mueller Hinton y sensibilizadores con cloramfenicol, agua destilada y el aceite esencial del romero utilizando la técnica de Kirby Baüer. El aceite esencial posee actividad antimicrobiana moderada sobre la cepa de *Candida albicans* y una actividad pobre o reducida sobre la cepa de *Escherichia coli*, no hubo actividad sobre las otras cepas bacterianas. Se sugiere hacer una extracción metanólica para evaluar la efectividad de los extractos de *Rosmarinus officinalis*.

Palabras Clave: *Rosmarinus officinalis*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Pseudomona*, *Candida*, inóculo, sensibilizador, antimicrobiana, halo.



ABSTRACT

The use of many drugs and self-medication and non-prescription treatments conclusion has caused many are selected bacterial strains resistant to conventional drugs. That's why in this study we tested the efficacy of traditional medicine Mexican bacterial strains: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter rodentium* and *Candida albicans*. This was extracted essential oil of *Rosmarinus officinalis* evaluating antimicrobial activity. 50 cases were used Mueller Hinton agar and chloramphenicol sensitivity discs with distilled water and the essential oil of Rosemarinus technique using Kirby Bauer. The essential oil has moderate antimicrobial activity on *Candida albicans* strain and poor or reduced activity on *Escherichia coli* strain, no activity against other bacterial strains. Extraction is suggested to evaluate the effectiveness methanolic extracts of *Rosmarinus officinalis*.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Candida*, inoculum sensidisco, microbial, halo.



INDICE

| | |
|---|----|
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 1 |
| HIPÓTESIS | 1 |
| SUSTENTO TEÓRICO | |
| Etnobotánica y Herbolaria..... | 1 |
| La herbolaria en México..... | 3 |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | 4 |
| Cepas Bacterianas..... | 5 |
| OBJETIVOS | 7 |
| METODOLOGÍA | |
| Materiales..... | 7 |
| Procedimiento..... | 8 |
| RESULTADOS | 9 |
| CONCLUSIONES | 12 |



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El progresivo deterioro de la relación hombre-medio ambiente se ha convertido en las últimas décadas en el centro de una ininterrumpida campaña destinada a sensibilizar a la opinión pública y ha llevado en parte a replantear algunos de los logros alcanzados en el pasado, y que constituyen la base del sistema de desarrollo de nuestra sociedad encaminada a la producción de bienes útiles y a menudo inútiles, para alcanzar la máxima comodidad.

El empleo de numerosos fármacos así como la automedicación y la no conclusión de los tratamientos recetados ha hecho que numerosas cepas bacterianas se seleccionen resistentes a los fármacos convencionales. Es por eso que probaremos en esta investigación la eficacia de la medicina tradicional mexicana en cepas bacterianas de: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Citrobacter rodentium* y *Candida albicans*.

HIPÓTESIS

Si el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* posee actividad antimicrobiana, entonces los cultivos de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Citrobacter rodentium* y *Candida albicans* no presentaran desarrollo alguno.

SUSTENTO TEÓRICO

ETNOBOTÁNICA O HERBOLARIA.

Desde tiempo inmemorial el hombre ha recurrido a las plantas en busca de curación para sus males y alivio a sus dolores, esa búsqueda lo ha hecho profundizar en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ella se extrae. La fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de las plantas nunca ha dejado de tener vigencia; muchas de las especies vegetales estimadas por sus virtudes



curativas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de la farmacopea medieval, que más tarde se vio enriquecida por el aporte de los conocimientos herbarios del lejano oriente y poco después por la vastísima tradición fitoterapéutica de los habitantes del nuevo mundo. Los mismos arboles, arbustos y hierbas que a través de los siglos sirvieron a herbolarios, curanderos y apotecarios para preparar infusiones, bálsamos, y emplastos curativos proporcionan hoy día materia prima a la moderna industria farmacéutica: casi la mitad de los medicamentos que se prescriben actualmente proceden del reino vegetal. ¹

Las propiedades curativas de las hierbas no han cambiado. Lo que fue hace mil años una hierba curativa lo sigue siendo. Era obligación de los médicos de los médicos del mundo antiguo conocer las hierbas.²

En esta época, en la que el consumo individual de medicamentos ha aumentado tanto, surge la tendencia a volver a las fuentes naturales para curar las enfermedades. ²

En México, la herbolaria ha sido y sigue siendo un recurso importante para buscar alivio a las enfermedades más comunes. Geográficamente privilegiado, el país posee una de las floras más ricas del planeta; culturalmente diverso, su herbolaria también se ha enriquecido por la observación y paciencia de los pueblos que durante siglos, han buscado apropiarse de su fuerza curativa. ³

La primera guerra mundial modificó de raíz el desarrollo de la medicina y de la ciencia en general. Por primera vez el hombre se enfrentó a la necesidad de contar con millones de dosis de medicamentos para atender a cientos de miles de heridos, los gobiernos de los países en conflicto comprendieron que la industria farmacéutica de preparados galénicos no era capaz de abastecer con productos de plantas medicinales los requerimientos de sus ejércitos. ³

1. Selecciones del Reader's Digest. (1987). PLANTAS MEDICINALES. VIRTUDES INSOSPECHADAS DE PLANTAS CONOCIDAS. Reader,s Digest. México. 9-23pp.
2. Castleman, M. (1997). HIERBAS CURATIVAS. Diana. México. 1-3, 425-428 pp.
3. Lozoya. (1999). Dirección General de Publicaciones del Consejo Nacional para la Cultura y las Artes en la ciudad de México. <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/3milenio/herbo/htm/frame1.htm>



La segunda guerra mundial demostró que la producción de medicamentos se había convertido en una actividad estratégica de los países enfrentados. Las dificultades para producir medicamentos masivamente y la posibilidad de ganar la guerra dependían del desarrollo científico de la medicina y en particular, de la farmacia. ³

Estos factores estimularon la investigación de medicamentos y fue la química de síntesis la disciplina que ofreció la solución para el periodo inmediato. De pronto, resultaba que la ciencia era capaz de sintetizar en el laboratorio los compuestos químicos presentes en las plantas y con ellos producir los medicamentos requeridos. ³

La herbolaria empezó a ser vista como una antigualla. Las plantas medicinales habían sido importantes en el pasado como medicamentos históricamente valiosos, pero al convertirse en la fuente de compuestos químicos lo que resultaba importante conocer era, solamente, el principio activo presente en el vegetal, esa sustancia a la cual el extracto, la tisana* o el emplasto* debían su poder curativo. ³

LA HERBOLARIA EN MÉXICO.

El Herbario Nacional de México (MEXU) custodia la colección más importante de plantas mexicanas. Con más de 1 300 000 ejemplares es el herbario más grande del país y América Latina; se encuentra entre uno de los diez herbarios más activos del mundo. Esta colección es un logro de numerosas generaciones de botánicos y exploradores nacionales y extranjeros. Su historia se remonta a finales del siglo XIX cuando surge el Instituto Médico Nacional en 1888, como la institución oficial encargada de integrar los conocimientos sobre los recursos naturales. Hacia 1915 el herbario se consolidó e impulsó al reunirse las colecciones nacionales de plantas como parte de la Dirección de Estudios Biológicos. ⁴

4. Dávalos R. (2011). HERBOLARIA EN MÉXICO, UNA TRADICIÓN ANCESTRAL Y VIGENTE. UNAM. <http://www.revistaantidoto.com/reportaje.php?ed=10>

3. Lozoya. (1999). Dirección General de Publicaciones del Consejo Nacional para la Cultura y las Artes en la ciudad de México. <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/3milenio/herbo/htm/frame1.htm>



En 1929 la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del Instituto de Biología, adquiere la custodia del herbario en donde el trabajo y la visión de sus administradores, científicos de talla mundial, han logrado mantener activa la colección dotándola de la infraestructura necesaria para su crecimiento, preservación y uso por la comunidad científica. Los usos mejor representados son el comestible, el medicinal y el artesanal con objetos hechos de materiales de diferentes especies vegetales o partes útiles como: raíces, hojas, tallos, bulbos, rizomas, cortezas, botones florales, inflorescencias, frutos, semillas, etc. 4

El Romero; *Rosmarinus officinalis*.

En la antigua Grecia los estudiantes se ponían ramitas de romero en el pelo, pues se decía que la planta fortalecía la memoria. Con el transcurso del tiempo se fueron adjudicando al romero otros poderes curativos como: agente para prevenir la intoxicación por alimentos, auxiliar digestivo, antiespasmódico, descongestionante y antibacterial, ya que contienen agentes químicos que pueden ayudar a combatir las bacterias y hongos que provocan infecciones estomacales. Se emplea la infusión de agradable aroma para calmar el estómago, pero debe tomarse diluida. 2

Reino: Vegetal

Familia: Labiatae

Género: *Rosmarinus*

Especie: *Rosmarinus officinalis*



Rosmarinus officinalis

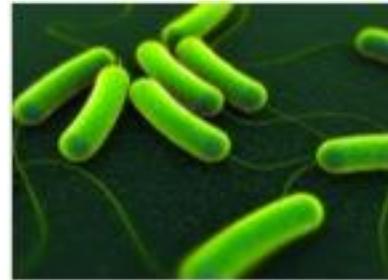
4. Dávalos R. (2011). HERBOLARIA EN MÉXICO, UNA TRADICIÓN ANCESTRAL Y VIGENTE. UNAM. <http://www.revistaantidoto.com/reportaje.php?ed=10>
2. Castleman, M. (1997). HIERBAS CURATIVAS. Diana. México. 1-3, 425-428 pp.



CEPAS BACTERIANAS

- *Salmonella typhi*

Las salmonellas son bacterias gram-negativas, lo cual significa que no se tiñen de azul con el colorante aplicado en la prueba diseñada por Gram. Esto se debe a que dicho colorante tiñe la pared celular, que en estos casos está cubierta por una membrana externa. Es así que estas bacterias están envueltas por varias capas: la membrana externa, la pared celular (que es diez veces más delgada que en las bacterias gram-positivas), y la membrana interna. La membrana externa e interna delimitan al periplasma. La apariencia de las bacterias en el microscopio es de bacilos, o cilindros con puntas redondeadas. Causa la fiebre tifoidea en humanos, quienes son sus únicos hospedantes. ⁵



Salmonella typhi, microscopio electrónico

- *Pseudomona aeruginosa*.

Esta especie de *Pseudomona* es la única patógena para el hombre, son bastoncitos delgados y pequeños de 1.5-3 micras de largo y 0.5 micras de ancho. Las colonias son grandes y diseminadas, de bordes rugosos y regulares grasos, son gram negativas. En los seres humanos causa endocarditis, neumonía y meningitis con bacteriemia generalizada y frecuentemente mortal, sobre todo en pacientes de edad madura. Las infecciones por *Pseudomonas* son difíciles de tratar por la resistencia de los microorganismos a los antibióticos. ⁶



Pseudomona en agar sangre.

5. Calva, E. *Salmonella typhi* Y LA FIEBRE TIFOIDEA: DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR A LA SALUD PÚBLICA. Instituto de Biotecnología . UNAM. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap4/>

6. Freeman, B. (1983). TRATADO DE MICROBIOLOGÍA. Interamericana. México. 450-600pp



- *Escherichia coli*

Es huésped constante del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente.

Por su especificidad está considerado como un buen índice de contaminación fecal, son gramnegativas y tienen forma de bacilo. ⁸

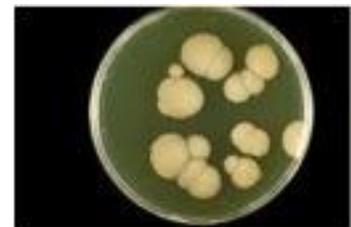


- *Candida albicans*

Suele presentarse como una célula oval con un tamaño medio de 2 a 4 micras; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas cuyos extremos presentan diámetros de 3 a 5 micras. El hombre es el principal reservorio de este tipo de hongo. Podemos encontrarlo de forma habitual en piel, estómago, colon, recto, boca y garganta de individuos sanos. Candida, en principio no es patógeno, ya que la flora bacteriana beneficiosa y el sistema inmunitario limitan su crecimiento y frenan su excesiva proliferación, manteniendo así un equilibrio.

Ahora bien, si el equilibrio existente se rompe *Candida albicans* empieza a proliferar y puede dar lugar a un conjunto de enfermedades denominadas **Candidiasis** o **micosis candidiásica**, que pueden consistir en leves infecciones de mucosas y piel o desencadenar diseminaciones sistémicas graves, pudiendo afectar órganos vitales. ⁷ Citrobacter

Grupo de bacilos gramnegativos aerobios que se encuentran frecuentemente en el agua, suelo, comida y el tracto intestinal de animales y humanos.



Candida albicans



OBJETIVOS

- Extraer los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre cepas de: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Citrobacter rodentium* y *Candida albicans*.
- Identificar la MIC (concentración mínima inhibitoria) y la CBM (concentración máxima bactericida)

METODOLOGÍA

Materiales

Para la siembra: cepas bacterianas de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Citrobacter rodentium* y cepa de *Candida albicans*, agar Mueller Hinton (BD bioxon), asas de siembra, autoclave, gradillas, papel filtro, agua destilada, matraces Erlenmeyer de 1000 ml, mecheros bacteriológicos, cloramfenicol ofteno de 5mg/ml, micropipeta. Para el extracto: refrigerante, matraces Erlenmeyer de 500ml , mechero de bunsen, tripie, pinzas, manguera de hule.

Procedimiento:

- Obtención e identificación de la planta.

La planta se compró en el mercado Nueva Sta. María ubicado en la colonia con el mismo nombre y la identificación de la planta se solicitó en el herbario de la facultad de ciencias. La clave de registro es AS5722.



Foto 1. *Rosmarinus officinalis*

- Extracción del aceite esencial.



Foto 2. Dispositivo de arrastre de vapor



Por arrastre de vapor se extrajo el aceite esencial del romero, con un rendimiento de 5gr por un kilo de romero.

- Obtención de las cepas bacterianas.

Las cepas se obtuvieron en el laboratorio de biología experimental de la UAM Xochimilco. Las cepas donadas fueron: *Candida albicans* con número ATCC1025, *Citrobacter rodentium* con número ATCC407, *Escherichia coli* con número ATCC1040, *Salmonella typhi*, y *Pseudomona aeruginosa*.

1

- Preparación de los inóculos.

Se inocularon 10 μ l en sensidiscos de papel filtro. Como control positivo se utilizó cloranfenicol oftálmico, como control negativo agua destilada y como grupo experimental el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*.



Foto. 4 Sensidiscos preparados

- Siembra.

Para calcular el número de patógenos en el inóculo se siguió la escala de Mc. Farland con una concentración de 1×10^8 bacterias por ml.

Para la siembra se utilizó la técnica de Kirby Baüer que consiste en sembrar las bacterias por estrías, colocar los sensidiscos e incubar a 37°C por 24 horas.

Se sembraron 5 cepas, cada una con sus controles y el aceite esencial. De cada cepa se hicieron 10 repeticiones.



Finalmente se midieron los halos de inhibición



Foto. 6 Colocación de los sensidiscos en las cajas sembradas



Foto. 7 Halos de inhibición

RESULTADOS

8

| Nombre de la cepa | Cloramfenicol | Agua destilada | Aceite esencial de romero |
|------------------------------|---------------|----------------|------------------------------|
| <i>Salmonella typhi</i> | 14.13 | 0 | 0 |
| <i>Citrobacter rodentum</i> | 11.75 | 0 | 0 |
| <i>Escherichia coli</i> | 2.75 | 0 | 0.5 |
| <i>Candida albicans</i> | 14.13 | 0 | 1.5 |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 2.25 | 0 | 0 |

Tabla1. Se observan los promedios de los halos de inhibición en mm, del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* en las cepas utilizadas.

En la tabla 1 podemos apreciar que comparado con el grupo control el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* carece de actividad antimicrobiana para 3 de las 5 cepas utilizadas. Las cepas con mayor halo de inhibición con el cloramfenicol fueron *Salmonella typhi* y *Candida albicans*, sin



embargo el extracto romero resulto ser inocuo para la primera cepa y presento un halo de inhibición de casi 2 mm.

| Nombre de la cepa | Sensibilidad al aceite esencial de Romero |
|------------------------------|---|
| <i>Salmonella typhi</i> | -- |
| <i>Citrobacter rodentum</i> | -- |
| <i>Escherichia coli</i> | + |
| <i>Candida albicans</i> | ++ |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> | -- |

Tabla 2. Tabla en la que se observa la sensibilidad del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* en cada cepa. ++++muy sensible, +++ sensible, ++ sensibilidad media, + pobre y – nula.

La tabla 2 permite observar claramente la sensibilidad del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) en las cepas bacterianas utilizadas en el experimento. La actividad antimicrobiana del aceite va desde sensibilidad moderada con las cepas de *Candida albicans* y *Escherichia coli*, hasta nula para el resto de las cepas utilizadas.

El rendimiento del romero es muy bajo, ya que de 1 kg solo se obtuvieron 5 grs. de aceite esencial.

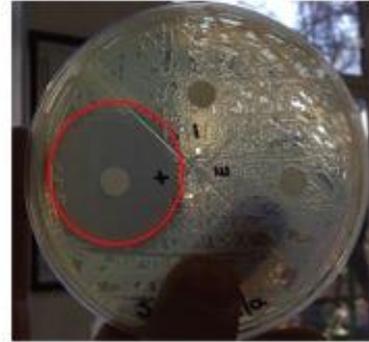
La concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración máxima bactericida (CBM) no se calcularon ya que la sensibilidad de las cepas al extracto fue reducida.

En las siguientes fotografías podemos apreciar los halos de inhibición presentados por las cepas ante el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*.

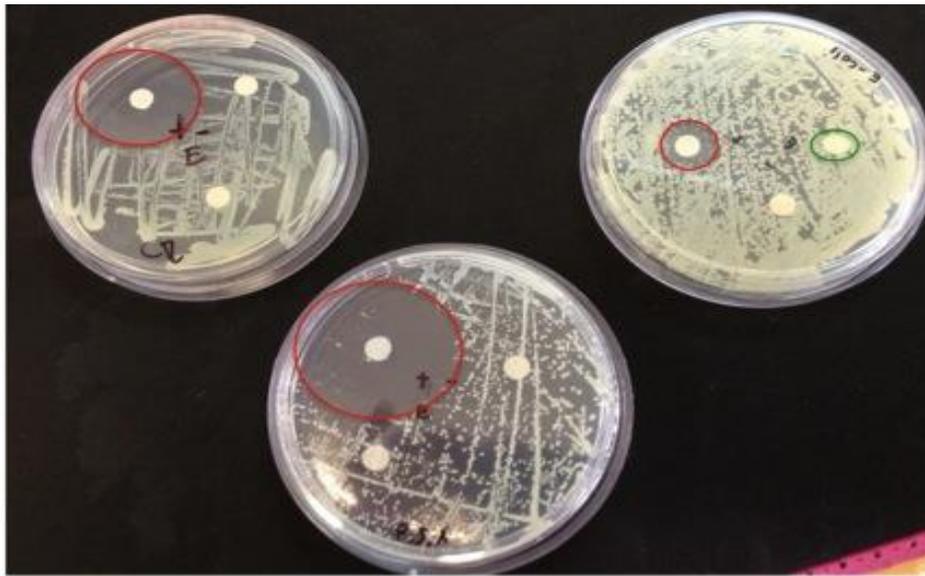




Fotografía 8. En la que se observan los halos de inhibición del aceite de *Rosmarinus officinalis* en la cepa de *Candida albicans*, Con rojo el halo del cloramfenicol y con verde el halo del romero.



Fotografía 9. Halo de inhibición de aceite de romero en *Salmonella typhi*.



Fotografía 10. En la que se observan los halos de inhibición del aceite de romero en las cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Citrobacter rodentum*. Con rojo los halos del cloramfenicol y con verde los del extracto de *Rosmarinus officinalis*.



La bibliografía consultada sugiere que el romero tiene una gran actividad sobre cepas bacterianas que causan malestar estomacal, intoxicación por alimentos e infecciones por microorganismos patógenos, sin embargo nosotros no obtuvimos resultados que revelen que el aceite esencial es contundente en el tratamiento de infecciones bacterianas, esto pudo ser causado porque al realizar la extracción por arrastre de vapor (en caliente), dicho extracto pudo haber perdido sus propiedades, por lo que una extracción en frío o con solventes polares y/o no polares que arrastren los metabolitos secundarios presentes en la planta podrían arrojar otros resultados, por lo que se sugiere modificar algunas variables.

CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* no tiene actividad antimicrobiana sobre las cepas de *Salmonella typhi*, *Citrobacter rodentum* y *Pseudomona aeruginosa*.
- El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* presentó una actividad moderada para el hongo de *Candida albicans*.
- La cepa de *Escherichia coli* fue sensible para el aceite esencial de romero.
- No fue posible calcular la MIC y CBM por la baja sensibilidad del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*.
- La baja sensibilidad del aceite esencial pudo ser causada porque muchos aceites pierden sus propiedades al calentarse, por lo que sería conveniente realizar la extracción del aceite con una destilación en frío.
- También podrían extraerse algunos metabolitos secundarios por polaridad, utilizando solventes polares y no polares.
- Se sugiere realizar la extracción del aceite esencial en frío, para verificar su eficacia sobre las cepas utilizadas.
- Pretendemos extraer compuestos con acetato de etilo, metanol y cloroformo para comprobar su eficacia en el tratamiento de *Salmonella typhy*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* para poder compartirlos con ustedes en la ponencia.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Selecciones del Reader's Digest. (1987). PLANTAS MEDICINALES. VIRTUDES INSOSPECHADAS DE PLANTAS CONOCIDAS. Reader,s Digest. México. 9-23pp.
2. Castleman, M. (1997). HIERBAS CURATIVAS. Diana. México. 1-3, 425-428 pp.
3. Lozoya. (1999). Dirección General de Publicaciones del Consejo Nacional para la Cultura y las Artes en la ciudad de México.
<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/3milenio/herbo/htm/frame1.htm>
4. Dávalos R. (2011). HERBOLARIA EN MÉXICO, UNA TRADICIÓN ANCESTRAL Y VIGENTE. UNAM.
<http://www.revistaantidoto.com/reportaje.php?ed=10>
5. Calva, E. *Salmonella typhy* Y LA FIEBRE TIFOIDEA: DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR A LA SALUD PÚBLICA. Instituto de Biotecnología . UNAM.
<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap4/>
6. Freeman, B. (1983). TRATADO DE MICROBIOLOGÍA. Interamericana. México. 450-600pp.
7. *Candida Albicans*, UN HONGO OPORTUNISTA. Revista Mi herbolario. Sección salud. Número 38.
<http://www.miherbolario.com/articulos/salud/6/candida-albicans-un-hongo-oportunista>
8. Ingraham, J. e Ingraham C. (1998). INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA. Reverté S. A. Barcelona. 568-569 pp.

