

Revista Electrónica Nova Scientia

Composición química y efecto antibacteriano *in vitro* de extractos de *larrea tridentata*, *origanum vulgare*, *artemisa ludoviciana* y *ruta graveolens*

Chemical composition and antibacterian effect
in vitro of extracts of *larrea tridentata*,
origanum vulgare, *artemisa ludoviciana* and
ruta graveolens

**Lucía Delgadillo Ruiz¹, Rómulo Bañuelos Valenzuela²,
Olivia Delgadillo Ruiz³, Mónica Silva Vega² y Perla Gallegos
Flores¹**

¹ Laboratorio de Biotecnología, Unidad Académica de Ciencias Biológicas,
Universidad Autónoma de Zacatecas

² Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Autónoma de Zacatecas

³ Campus San Luis Potosí, Colegio de Postgraduados

México

Rómulo Bañuelos Valenzuela. E-mail: apozolero@hotmail.com

© Universidad De La Salle Bajío (México)

Resumen

Introducción. Los extractos de algunas plantas han demostrado tener propiedades antimicrobianas relacionadas a ciertos compuestos químicos como son el timol, carvacrol, limoneno, linalol y terpineno. El objetivo del presente trabajo fue determinar la concentración de estos compuestos en los extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*; así como evaluar su efecto antimicrobiano en *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumanii*, *Pseudomonas* sp y *Staphylococcus aureus*.

Método. Los extractos se obtuvieron por destilación simple empleando alcohol etílico como solvente, la composición química se evaluó mediante cromatografía de gases. La actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos de plantas se realizó por los métodos difusión en pozo y difusión en disco.

Resultados. Las bacterias mostraron diferentes grados de sensibilidad a los extractos, presentando inhibición de crecimiento *S. aureus* con el extracto de *O. vulgare* y *R. graveolens*, mientras que la bacteria *Pseudomonas* sp., con los extractos de *A. ludoviciana*, *L. tridentata* y *O. vulgare*.

Discusión. La mayor concentración de timol y carvacrol se encontró en los extractos de *O. vulgare* y *L. tridentata*. El compuesto linalol se encontró en una proporción mayor en *O. vulgare* y en menor proporción en *A. ludoviciana*. Limoneno se encontró en los extractos de *O. vulgare* y *R. graveolens*. De las cuatro plantas evaluadas, el extracto de *L. tridentata* fue mejor, debido a que presenta la mayor inhibición en comparación con los otros extractos; y con un efecto similar a los aceites empleados como control. La técnica de difusión en disco, permitió observar mejor los efectos inhibitorios de los extractos y los aceites sobre cada una de las bacterias empleadas en comparación con el método de difusión en pozo.

Palabras Clave: Extractos; actividad antimicrobiana; bacterias; inhibición

Recepción: 14-06-2017

Aceptación: 09-07-2017

Abstract

Introduction. Plant extracts have been shown to have antimicrobial properties related to certain chemical compounds such as thymol, carvacrol, limonene, linalool and terpinene. The objective of this study was to determine the concentration of these compounds in the extracts of *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* and *Ruta graveolens*; as well as to evaluate the antimicrobial effect in *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumanii*, *Pseudomona* sp and *Staphylococcus aureus*.

Method. The extracts were obtained by simple distillation using ethyl alcohol as solvent, the chemical composition was evaluated by gas chromatography. The antimicrobial activity of each of the plant extracts was performed by well diffusion and disk diffusion methods.

Results. The bacteria showed different degrees of sensitivity to the extracts, *S. aureus* inhibition of growth with the extract of *O. vulgare* and *R. graveolens*, while the bacterium *Pseudomona* sp. showed inhibition with the extract of *A. ludoviciana*, *L. tridentata* and *O. vulgare*.

Discussion. The highest concentration of thymol and carvacrol was found in the extracts of *O. vulgare* and *L. tridentata*. The compound linalool was found in a higher proportion in *O. vulgare* and to a lesser extent in *A. ludoviciana*. Limonene was found in the extracts of *O. vulgare* and *R. graveolens*. Of the four plants evaluated, *L. tridentata* extract was better because it had the highest inhibition compared to the other extracts; and with an effect similar to the oils used as control. The disk diffusion technique allowed better observation of the inhibitory effects of the extracts and oils on each of the bacteria used in comparison to the well diffusion method.

Keywords: Extracts; antimicrobial activity; bacteria, inhibition

Introducción

Los extractos de plantas han sido empleados por el hombre en el tratamiento de enfermedades bacterianas. Estos son mezclas complejas de metabolitos secundarios lipófilos volátiles. Son extraídos de las plantas con disolventes y destilación por arrastre de vapor (Burt, 2004). Factores ambientales, la etapa de crecimiento y la salud de la planta determinan las concentraciones de los extractos (Dudareva *et al.* 2004).

La sensibilidad de las bacterias a aceites esenciales no es constante, esta propiedad es de interés para los nutricionistas rumiantes por la aplicación en los cambios de la fermentación en el rumen a través de la selección a favor o en contra de grupos específicos de microorganismos (Benchaar y Greathead, 2011). Cowan (1999), Kalemba y Kunicka (2003) y Burt (2004) han reportado las propiedades antimicrobianas y fungicidas que tienen los aceites esenciales de plantas.

Los compuestos de estos aceites, como timol, carvacrol y monoterpenos fenólicos presentan actividad antimicrobiana y se encuentran en altas concentraciones en aceite de orégano (Helander *et al.* 1998; Ultee *et al.* 2000 a, b). Paparella *et al.* (2008) y Xu *et al.* (2008) demostraron que el aceite de orégano es eficaz para aumentar la fluidez y la permeabilidad de la membrana citoplasmática dando lugar a la pérdida del contenido celular y la lisis celular de los microorganismos.

En relación con *L. tridentata* o gobernadora se ha documentado que más de 45 bacterias son susceptibles a su resina o sus componentes, así como a diez levaduras, nueve hongos y tres parásitos intestinales que atacan a los humanos comprometiendo su estado de salud. Los compuestos presentes en la gobernadora como los flavonoides actúan contra virus que afectan el RNA, y que ocasionan graves enfermedades como polio, sida y herpes (Saldívar, 2003).

Algunas especies de *Artemisia* (*A. absinthium*, *A. biennis*, *A. frigida* y *A. ludoviciana*) han sido utilizadas como antisépticos en la medicina tradicional por los nativos de América del Norte debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Entre sus usos se puede mencionar el tratamiento de yagas, heridas e infecciones de pecho (Lopes-Lutz *et al.* 2008).

Pathak *et al.* (2003) y Pandey *et al.* (2011) mencionaron que el extracto hidro-alcohólico de hojas de *Ruta graveolans* puede ser usado como un potente antiparasitario, antioxidante y antimicrobiano. Pandey *et al.* (2012) demostraron que el extracto de *R. graveolans* puede ser usado para disminuir la incidencia y gravedad de diarreas en ratones.

Se han encontrado serios problemas de resistencia de microorganismos a los medicamentos antimicrobianos, dentro de los cuales destaca *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, en especial en el ámbito hospitalario; mientras las infecciones por *Staphylococcus* no adquiridas en hospitales pueden tratarse con los antibióticos derivados betalactámicos, las infecciones adquiridas en hospitales son, en su gran mayoría, resistentes a estos antibióticos y requieren tratamientos alternativos más costosos y, muchas veces, de mayor toxicidad. La resistencia se extiende a antimicóticos, antimaláricos y antivirales, haciendo cada vez menos efectivos los viejos medicamentos (AHFS, 2005).

Este problema de la resistencia se ha extendido igualmente al campo de la terapéutica veterinaria pues el uso indiscriminado de antibióticos y a veces su adición en los concentrados usados en la alimentación de animales, ha determinado que muchas bacterias como *E. coli* hayan adquirido cada vez mayor resistencia.

La obtención de antibióticos a partir de hongos o desde la síntesis química ha disminuido sustancialmente en los últimos 30 años. La industria farmacéutica y la comunidad científica basados en los resultados del aprovechamiento de plantas superiores de uso tradicional para el cuidado de la salud están estimulando su uso como antibióticos. Diversos autores de países desarrollados en la síntesis química mencionan la importancia de recurrir a fuentes naturales, entre ellas las plantas, para explorar nuevas moléculas con actividad antiinfecciosa (Ramírez *et al.* 2013; González *et al.* 2017).

Por lo que, el objetivo de este estudio fue determinar la concentración de timol, carvacrol, linalol, terpinene y limoneno en los extractos de *L. tridentata*, *O. vulgare*, *A. ludoviciana* y *R. graveolens*; para evaluar su efecto antimicrobiano en *E. coli*, *A. baumanii*, *Pseudomona* sp y *S. aureus* por los métodos de difusión en pozo y difusión en disco.

Método

El estudio se realizó en el estado de Zacatecas, México. Se utilizaron plantas de la medicina tradicional *L. tridentata*, *O. vulgare*, *A. ludoviciana* y *R. graveolens*, comúnmente llamadas gobernadora, oregano, estafiate y ruda respectivamente. Fueron recolectadas de crecimiento silvestre durante primavera y verano de 2013-2014. Cada una de las plantas fue secada a temperatura ambiente durante al menos dos semanas, después fueron desecadas durante 24 horas

en un horno convencional a 45°C, para eliminar completamente la humedad, y fueron molidas y almacenadas en bolsas herméticas para procedimientos posteriores (López *et al.* 2005).

En cada extracción se utilizó etanol al 70%. En frascos de color ámbar de un litro fueron colocados veinte gramos de la muestra molida por cada 300 mL de solvente. La muestra fue sellada y mezclada vigorosamente por 10 min. Se dejó macerar durante un mes, a temperatura ambiente agitando cada tres días la mezcla por 10 min. El sobrenadante fue pasado a través de papel filtro (Whatman No. 2) para remover los restos del polvo de la planta y el solvente fue evaporado en un extractor tipo Soxhlet a 85°C (Pesewu *et al.* 2008). Se hicieron dos alícuotas; una de ellas fue utilizada para determinar la composición química del extracto y otra para evaluar la actividad antimicrobiana.

Composición química del extracto por cromatografía de gases

La composición química se determinó mediante el uso del cromatógrafo de gases (CG) Agilent Tecnologies serie 6890N empleando una columna polar DB_WAXetr. Las condiciones de trabajo fueron: temperatura después de la inyección 250°C a una presión de 12.13 psi con un flujo de He 36.5 mL/min. Las condiciones para la columna fueron: temperatura inicial 50°C de cero a dos minutos, aumentando 10°C hasta llegar a 250°C, manteniendo la temperatura constante por cinco minutos para luego descender a 50°C por dos minutos con un flujo de He de 1.6 mL/min a una presión de 12.13 psi y una velocidad promedio de 25 cm/seg. Utilizando un detector de ionización de flama (FID) a una temperatura de 210°C con un flujo de H₂ de 40 mL/min y un flujo de aire de 450 mL/min, permitieron cuantificar los compuestos en las muestras.

Cuadro 1. Concentraciones empleadas de los estándares para la cuantificación en el CG

Estándar	Timol (mg/ml)	Carvacrol (mg/ml)	Linalol (mg/ml)	Terpineno (mg/ml)	Limoneno (mg/ml)
1	10.373	8.284	7.744	7.154	8.496
2	5.186	4.142	3.872	3.577	4.248
3	2.593	2.071	1.936	1.789	2.124
4	1.297	1.035	0.968	0.894	1.062
5	0.648	0.518	0.484	0.447	0.531
6	0.324	0.259	0.242	0.224	0.265

Fuente de bacterias

Se utilizaron bacterias gram negativas: *E. coli*, *A. baumanii* y *Pseudomonas* sp., y una bacteria gram positiva: *S. aureus*, las cuales fueron identificadas por pruebas bioquímicas en paneles comerciales por el equipo Phoenix 100 Becton Dickinson and Company® Sparks, Maryland 21152 USA. A partir de las bacterias cultivadas en el agar nutritivo, fueron seleccionadas cuatro o cinco colonias de cada una y se diluyeron en solución salina, hasta alcanzar una concentración de 0.45° McFarland para *E. coli*, 0.56° McFarland *A. baumanii*, 0.54° McFarland *Pseudomonas* sp., y 0.55° McFarland *S. aureus*. Se realizó una siembra masiva sobre agar Mueller Hinton (Álvarez et al. 2005), se escogieron el CEDAX ceftibuten (36 mg/mL) como control positivo para *E. coli*, *A. baumannii*, *Pseudomonas* sp. (Barriga et al. 2008) y Butimaxil dicloxacilina (50 mg/mL) para *S. aureus* (Paniagua et al. 2006). Además, se trabajó con dos aceites: *O. vulgare* y hojas de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) utilizados como controles positivos por su actividad antimicrobiana comprobada en otros trabajos (Matos et al. 2010; Brito-Junior et al. 2012; Rosas-Piñón et al. 2012) y como control negativo agua destilada.

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de cada extracto se determinó por dos métodos: difusión en pozo (perforación en gel de agar) (Álvarez et al. 2005) y difusión en disco (método disco-placa-cultivo) (Albado et al. 2001). En el medio Mueller Hinton, ya solidificado, se hicieron cuatro perforaciones de 7 mm de diámetro, se sellaron con 20 µL del mismo agar, para evitar la dispersión del extracto. Las cepas diluidas de la misma forma que en el antibiograma, se sembraron masivamente y, una vez realizado esto, a cada pozo se le adicionó 20 µL de cada extracto y 20 µL de agua destilada, como control negativo, se incubó a 37°C, por 24 horas. En la difusión de disco, las cepas diluidas se sembraron masivamente sobre el agar y se colocaron en la superficie de los medios cuatro discos de papel de filtro (Whatman) de 7 mm de diámetro, impregnados con 20 µL de cada uno de los extractos y agua destilada como control negativo, los cuales se incubaron a 37°C por 24 horas. Ambas pruebas se efectuaron por triplicado. Se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos y el cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo, se estimó aplicando la expresión (Martínez et al. 1996):

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{\text{Media diámetro halo de inhibición}}{\frac{\text{Diámetro halo de inhibición}}{\text{control positivo}}} \times 100 \quad (1)$$

Análisis estadístico

Se aplicó ANOVA unifactorial; la prueba de Tukey, para comparar las medias entre más de dos grupos. La significancia, se reportó con un nivel de confianza del 99% ($p=0.01$). Para realizar estos cálculos, se empleó el programa estadístico SPSS 17.0.

Resultados

En el Cuadro 2 se muestra el volumen y el rendimiento de los extractos de *L. tridentata*, *O. vulgare*, *A. ludoviciana* y *R. graveolens* obtenidos. Los valores que se muestran representan el promedio de las repeticiones. El cuadro 3 muestra la composición química de cada uno de los extractos obtenidos por cromatografía de gases.

Cuadro 2. Rendimiento de los extractos de 20 gramos de cada una de las plantas

Muestra	Volumen extracto (mL)	Rendimiento % (W/W)
<i>L. tridentata</i>	19.43	6.475
<i>O. vulgare</i>	41.5	13.83
<i>A. ludoviciana</i>	17.95	5.98
<i>R. graveolens</i>	31.5	10.5

Cuadro 3. Composición de los extractos mediante cromatografía de gases

Extractos	Timol (mg/mL)	Carvacrol (mg/mL)	Linalol (mg/mL)	α -Terpineno (mg/mL)	Limoneno (mg/mL)
<i>L. tridentata</i>	4.3033	7.7986	----	-----	----
<i>O. vulgare</i>	4.185	9.1027	12.5526	-----	6.6491
<i>A. ludoviciana</i>	2.5184	4.9087	2.886	5.1276	-----
<i>R. graveolens</i>	1.1626	2.8557	-----	-----	5.8022

En los Cuadros 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos de la medición del diámetro de halos de inhibición de los microorganismos estimados con las técnicas de difusión en pozo y en disco. Se utilizó como control positivo los aceites de orégano y canela ya que se ha reportado que presentan mayor efecto inhibitorio que un extracto por su composición química o sus compuestos activos (Duarte *et al.* 2005; Matos *et al.* 2010; Rosas-Piñón *et al.* 2012).

Cuadro 4. Efecto inhibitorio de los extractos mediante el método de disco

Muestras	Diámetro halos de inhibición (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>A. baumanii</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>S. aureus</i>
Extracto <i>L. tridentata</i>	17 ^c	19 ^c	15 ^{c,d}	12 ^{b,c}
Extracto <i>O. vulgare</i>	10 ^d	10.24 ^d	12.26 ^{d,e}	15 ^b
Extracto <i>A. ludoviciana</i>	9 ^d	8 ^d	19 ^{b,c}	8 ^d
Extracto <i>R. graveolens</i>	9 ^d	9 ^d	8 ^e	15.5 ^{a,b}
Aceite <i>O. vulgare</i>	20.66 ^b	24.5 ^c	25 ^b	10.5 ^{c,d}
Aceite de hoja de <i>C. zeylanicum</i>	23 ^b	21 ^{c,b}	24.5 ^b	15 ^b
CEDAX ceftibuten	35.5 ^a	33 ^a	41 ^a	
Butimaxil dicloxacilina				19 ^a

Diferentes letras sobre las columnas de la tabla indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.01$).

Cuadro 5. Efecto inhibitorio de los extractos mediante el método de pozos

Muestras	Diámetro halos de inhibición (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>A. baumanii</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>S. aureus</i>
Extracto <i>L. tridentata</i>	7 ^c	13 ^{b,c}	19 ^c	7 ^b
Extracto <i>O. vulgare</i>	13 ^{c,b}	9 ^c	23 ^{c,d}	13 ^a
Extracto <i>A. ludoviciana</i>	7 ^c	8 ^c	7 ^d	7 ^b
Extracto <i>R. graveolens</i>	7 ^c	9 ^c	7 ^d	13 ^a
Aceite <i>O. vulgare</i>	21 ^{b,a}	7 ^c	27 ^b	7 ^b
Aceite de hoja de <i>C. zeylanicum</i>	15 ^{b,c}	19 ^b	7 ^d	7 ^b
CEDAX ceftibuten	29 ^a	45 ^a	37 ^a	----
Butimaxil dicloxacilina	----	----	----	15 ^a

Diferentes letras sobre las columnas de la tabla indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.01$).

En cuanto a la actividad antimicrobiana, se confirma que el extracto del *O. vulgare*, posee efecto antimicrobiano frente a bacterias gram positivas como *S. aureus* y sobre las bacterias gram negativas *E. coli*, *A. baumanii* y *Pseudomona* sp, mientras que el extracto de *A. ludoviciana* posee el mayor porcentaje de inhibición frente a *Pseudomona* sp., utilizando el método de disco, siendo diferente por el método de pozos donde el mayor porcentaje de inhibición se presenta en *S. aureus* efecto antimicrobiano en *A. baumanii*, por último el extracto de *R. graveolens* presentó mayor efecto antimicrobiano para *S. aureus*.

El porcentaje de efecto inhibitorio estimado mediante la ecuación 1, para el extracto de *L. tridentata* fue mayor para *S. aureus* por el método de difusión en disco; mientras que por el método de difusión en pozos fue mayor para *Pseudomona*. El extracto de *O. vulgare* y *R. graveolens* empleando los dos métodos, presentan mayor efecto inhibidor a la bacteria *S. aureus*. Finalmente, el extracto de *A. ludoviciana* por el método de difusión de disco presenta el mayor efecto inhibidor a la bacteria *Pseudomona* (Figura 1).

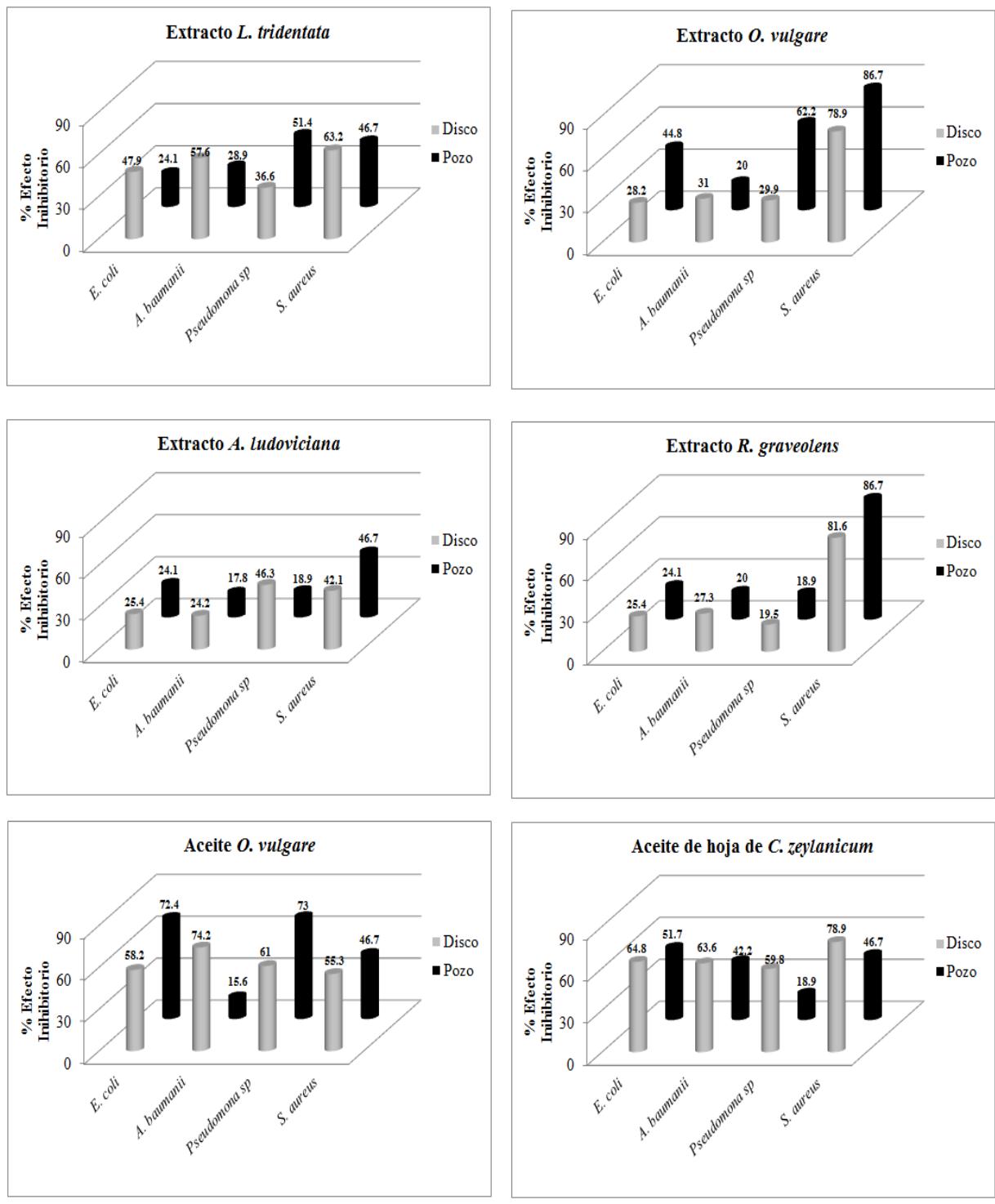


Figura 1. Porcentaje de efecto inhibitorio de los diferentes extractos y aceites.

Discusión o Conclusiones

La presencia de metabolitos secundarios en las plantas ofrece la posibilidad de encontrar moléculas bioactivas que tengan actividad antimicrobiana, estas son muy promisorias y buscadas afanosamente, en especial por el alarmante incremento de la resistencia bacteriana (Mukherjee, 2002).

Martins *et al.* (2013) reportan en su estudio que en extractos de *L. tridentata* contienen compuestos bioactivos del tipo fenólicos como los flavonoides, queracetina, keampferol y ácido nordihidroguaiarético, diferentes a los reportados en este trabajo. El extracto de *O. vulgare* está compuesto por limoneno, linalol, carvacrol y timol. Estos resultados coinciden con los reportados por Albado *et al.* (2001) quienes analizaron aceites de orégano e identificaron terpineoles, fenoles y compuestos relacionados metabólicamente con el carvacrol.

En la composición química del extracto de *A. ludoviciana* se encontró terpineno, linalol, timol y carvacrol. Estos resultados difieren de lo reportado por Kordali *et al.* (2005), ellos encontraron que el extracto *A. ludoviciana* contiene principalmente anetol, beta-ocimeno, limoneno y metileugenol, ninguno de estos compuestos fueron identificados en este estudio ya que se debe tener presente que los principios activos dependen de factores genéticos, agronómicos y ambientales de las plantas.

De Feo *et al.* (2002) reportan que la composición química del aceite esencial *R. graveolans* está integrada por terpenoides que constituyen 11.2 % del aceite, identificando α -pineno, limoneno y 1,8-cineole como los principales constituyentes. Coinciendo con los resultados obtenidos en la determinación de limoneno presente en *R. graveolans*.

Los constituyentes químicos: carvacrol, timol, terpineno, limoneno y linalol; dependiendo del origen y tipo de planta poseen efectos antimicrobianos, antifúngicos y antioxidantes (Blazer, 2002). Acciones antimicrobianas se le atribuyen principalmente al carvacrol y timol.

Los resultados del efecto antimicrobiano del extracto de *O. vulgare* frente a *E. coli* y *A. baumanii* coincide con lo reportado por Aligiannis *et al.* (2001), ellos también encontraron que los aceites esenciales de la especie *Origanum* presentan esta actividad inhibitoria en bacterias gram negativas.

El preciso mecanismo de acción antibacteriana de los extractos de plantas y de sus compuestos bioactivos aún no han sido plenamente establecidos, sin embargo, se conoce que ocasionan cambios en la composición de los ácidos grasos de la membrana celular bacteriana;

estos cambios han sido observados cuando las células son expuestas a concentraciones elevadas de los biocompuestos presentes en los extractos (Di Pascua *et al.* 2006). El carvacrol y timol dañan la membrana exterior de las bacterias gram negativas e incrementan la permeabilidad de la membrana citoplasmática que causa pérdidas de ATP, fuga de iones y lisis celular (Gill y Holley, 2006).

La composición química, las actividades antimicrobianas y antioxidantes de *A. ludoviciana* han sido analizadas por sus efectos inhibitorios sobre el crecimiento de bacterias y hongos. En relación con la composición química, en la literatura especializada se reporta que el extracto de *A. ludoviciana* contiene principalmente anetol (81%), beta-ocimeno (6.5%), limoneno (3.0%) y metileugenol (1.8%) (Kordali *et al.* 2005).

Sin embargo, en los resultados de esta investigación, solo se observa el efecto inhibitorio a *S. aureus*, bacteria gram positivo al extracto *A. ludoviciana*; las bacterias gram negativas como *E. coli* y *A. baumanii* no presentan el efecto inhibitorio al extracto *A. ludoviciana*. De acuerdo con Yun *et al.* (2008), la ubicación de la planta y la estación de crecimiento influyen en la actividad antimicrobiana en la especie *Artemisia orientalis*, por lo que estos aspectos deben ser considerados.

Burt *et al.* (2007) señalaron que bacterias de *E. coli* crecen en presencia de carvacrol a una concentración de 0.05 mg/mL sin síntesis de flagelos, provocando que el microorganismo crezca sin movilidad, es decir, cuando la célula bacteriana está sujeta a un estrés ocasionado por sustancias tóxicas y está en riesgo su viabilidad, la bacteria es capaz de suprimir funciones secundarias, como la formación del flagelo, y así conservar energía para otras funciones primordiales en la célula; este mecanismo de reacción bacteriana puede por lo tanto ser una táctica de supervivencia.

En relación con los extractos alcohólicos de *R. graveolens*, se encontró que tienen efecto inhibidor contra *E. coli*. El mismo resultado se observó sobre *S. aureus* que coincide por lo reportado por Castro *et al.* (2011).

Los resultados del presente trabajo permiten afirmar que los extractos de *L. tridentata*, *O. vulgare*, *A. ludoviciana* y *R. graveolens* son productores de sustancias bioactivas con efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*. Estas plantas se sumarían a las ya reportadas en la literatura científica como especies promisorias por su potencial bioactivo frente a dicha bacteria

(Arango *et al.* 2004; Nasar y Halkman, 2004) en una intensa y ansiosa búsqueda de antibióticos obtenibles de plantas.

De los cuatro extractos de plantas evaluados, el extracto de *L. tridentata* fue mejor debido a que presenta la mayor inhibición en comparación con los otros extractos; y con un efecto similar a los aceites empleados como control. La mayor concentración de timol y carvacrol se encontró en los extractos de *O. vulgare* y *L. tridentata*. En *O. vulgare* además se encontró la presencia de linalol y limoneno pero su efecto inhibidor fue menor en comparación con el extracto de *L. tridentata*. Es probable que parte de la efectividad antibacteriana de *L. tridentata* se atribuya no solo a timol y carvacrol, posiblemente otros compuestos no identificados en este estudio estén influyendo (Marttins *et al.* 2013). El terpineno solo se encontró en *A. ludoviciana*. Mientras que concentraciones de limoneno se encontraron en los extractos de *O. vulgare* y *R. graveolens*.

La técnica de difusión en disco, permitió observar mejor el efecto inhibitorio de los extractos y los aceites sobre cada una de las bacterias empleadas (*E. coli*, *A. baumanii*, *Pseudomonas sp* y *S. aureus*) en comparación con el método de difusión en pozo. Tomando como referencia el valor del diámetro del halo presente en la difusión de disco, es decir, a mayor diámetro de halo mayor será el efecto inhibitorio (como en este caso).

Los resultados obtenidos contribuyen al desarrollo de nuevas investigaciones relacionadas con el efecto antimicrobiano *in vivo* e *in vitro* de más bacterias ya sea de origen hospitalario o en el área de ciencias pecuarias. Por ejemplo, el uso de los extractos de plantas en la modificación de la fermentación ruminal que permita eficientizar el proceso de digestión, obteniendo mayor concentración de ácidos grasos volátiles, disminución de metano y dióxido de carbono (principales gases de efecto invernadero).

Referencias

- AHFS (ED). (2005). Drug Information. American Society of Health System Pharmacists. Pp. 48-887.
- Albado, Emilia P; Saez, Gloria F. y Grabiela, Sandra A. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Rev. Med. Hered. 12: 16-19.

- Álvarez, María L.; Isaza, Gustavo M. y Echeverry, Harold L. (2005). Efecto Antibacteriano in vitro de *Austroeupatorium inulaefolium* H.B.K. (Salvia amarga) y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. (Clavo de laguna). Biosalud. 14: 46-55.
- Aliagiannis, N.; Kalpotzakis, E.; Mitaku, S., and Chinou I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J. Agric. Food Chem. 49:4168-4170.
- Arango, A. M., Sánchez, J. B., and Galvis, L. B. (2004). Productos naturales con actividad antimicótica. Rev. Esp. Quimioterap, 17(4), 325-331.
- Barriga, A. G., González, N. F. M., & Arumir, E. C. (2008). Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de 1200 microorganismos Gram negativos causales de infecciones de vías urinarias. Enf. Inf. Microbiol, 28(3), 90-98.
- Benchaar, Chaouki and Greathead, Henry. (2011). Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. Anim. Feed Sci. Technol. 166–167: 338–355.
- Blazer, V. S. (2002). Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. Fish Physiology and Biochemistry, 26(1), 85-101.
- Brito-Júnior, Manoel, Nobre, Sergio A., Freitas, Juliana C., Camilo, Carla C. and Faria-e-Silva, André L. (2012). Antibacterial activity of a plant extract and its potential for disinfecting gutta-percha cones. Acta Odontológica Latinoamericana, 25(1), 9-13.
- Burt, Sara. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int. J. Food Microb. 94: 223–253.
- Burt, Sara, Zee, Ruurd, Koets, Ad., de Graaff, Anko, van Knapen, Frans, Gaastra, Wim., Haagsman, Henk and Veldhuizen, Edwin. 2007. Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. Applied and Environmental Microbiology, 73 (14): 4484-4490.
- Castro, Américo J.L.; Juárez, José R.E.; Ramos, Norma J.C.; Suárez, Silvia C.; Retuerto, Fernando P. y Gonzales, Sixto A.E. (2011). Structural elucidation of essential oil of *Ruta graveolens* L. Ruda, antioxidant activity and cytotoxicity bio-assay. Ciencia e Investigación. 14(1): 25-28.
- Cowan, Marjorie M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12: 564–582.

- De Feo, V., F. De Simone and F. Senatore. (2002). Potential allele chemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*. 61, 573–578.
- Di Pasqua, Rosangela, Hoskins, Nikki, Betts, Gail and Mauriello, Gianluigi. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(7), 2745-2749.
- Duarte, Marta C. T., Figueira, Glyn M., Sartoratto, Adilson, Rehder, Vera L. G. and Delarmelina, Camila. (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 97(2), 305-311.
- Dudareva, Natalia; Pichersky, Eran and Gershenson, Jonathan. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 135; 1893–1902.
- Gill, A. O. and Holley, R. A. (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International journal of food microbiology*, 111(2), 170-174.
- González, Rafael. P., Sánchez, Yurisnel. O., Rivera, Rodisnel. P., Mompié, Saray. A. and Ginarte, Marta. L. H. (2017). 07-Relación de las propiedades físico-químicas con la actividad farmacológica de *Zuedania guidonia* (guaguasí) Relationship of the physical-chemical properties with the pharmacological activity of *Zuedania guidonia* (guaguasí). *MULTIMED Revista Médica Granma*, 19(4): 76-87.
- Helander, Ilkka M.; Alakomi, Hanna L; Latva, Kyösti K.; Mattila, Tiina S.; Pol, Irene; Smid, Eddy J.; Gorris, Leon G.M. and Wright, Atte von. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3590–3595.
- Kalemba D. and Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10: 813–829.
- Kordali, Saban; Cakir, Ahmet; Mavi, Ahmet; Kilic, Hamdullah and Yildirim, Ali. (2005). Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish Artemisia species. *J. Agric Food Chem* 53: 1408-1416.
- Lopes-Lutz, Daíse, Alviano, Daniela S., Alviano, Celuta S. and Kolodziejczyk, Paul P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry*, 69(8), 1732-1738.

- López, Alvin J., García, Aura M. and Rojas, Jhon. J. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas.
- Martins, Silvia, Teixeira, José A. and I. Mussatto Solange. (2013). Solid-state fermentation as a strategy to improve the bioactive compounds recovery from *Larrea tridentata* leaves. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171: 1227–1239.
- Martínez, María J.; Betancourt, José B. y Alonso, Nancy G. (1996). Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de *Áloe vera* (sábila). *Rev. Cubana Plant Med.* 1(3):18-20. Doi: 10.1007/s12010-013-0222-2
- Matos Chamorro, R. A., Quispe Condori, S., Quito Vidal, M. R. y Beltrán Cárdenas, S. K. (2010). Evaluación de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) microencapsuladas en β-ciclodextrina aplicados en cultivos microbianos. *Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1).
- Mukherjee, P. K. (2002). Quality control of herbal drugs: an approach ro evaluation of botanicals. New Delhi: Business Horizons Publication.
- Nasar-Abbas, S. M. and Halkman, A. K. (2004). Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. *International journal of food microbiology*, 97(1), 63-69.
- Pandey, Pinkee, Mehta, Archana., Hajra, Subhadip., John, Jinu. and Mehta, Pradeep. (2011). Antioxidant property, total Phenolic content and inhibition of α-amylase activity of *Ruta graveolens* L. leaves extract. *J. Pharm. Res*, 4, 1735-1737.
- Pandey, Pinkee, Mehta, Archana and Hajra, Subhadip. (2012). Antidiarrhoeal activity of ethanolic extracts of *Ruta graveolens* leaves and stem. *Asian J Pharm Clin Res*, 5(4), 65-68.
- Paniagua, C. G. L., Monroy, P. E., Alonso T. J., Vaca, P. S., Negrete, A. E. and Pineda, O. J. (2006). Prevalencia de infecciones en herida quirúrgica en pacientes dados de alta de un hospital general. *Rev. Med. Hosp. Gen. México*, 69(2), 78-83.
- Paparella, Antonello; Taccogna, Lorenzo; Aguzzi, Irene; Chaves, Clemencia L.; Serio, Annalisa; Marsilio Fulvio and Suzzi, Giovanna. (2008). Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 19: 1174–1182.

- Pathak, Sen, Multani, Asha S., Banerji, Pratip and Banerji, Prasanta. (2003). Ruta 6 selectively induces cell death in brain cancer cells but proliferation in normal peripheral blood lymphocytes: A novel treatment for human brain cancer. International journal of oncology, 23(4), 975-982.
- Pesewu, George A., Cutler, Ronald. R. and Humber, David. P. (2008). Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. Journal of ethnopharmacology, 116(1), 102-111.
- Ramírez, Alexander C., Isaza, Gustavo M. and Pérez, Jorge E. C. (2013). Vegetal species studied by their antimicrobial, immunomodulatory and hypoglycemic properties in Caldas-Colombia, Southamerica. Biosalud, 12(1), 59-82.
- Rosas-Piñón, Yazmín, Mejía, Alicia, Díaz-Ruiz, Gloria, Aguilar, María I., Sánchez-Nieto, Sobeida, and Rivero-Cruz, J. Fausto. (2012). Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. Journal of ethnopharmacology, 141(3), 860-865.
- Saldívar, Ricardo H. L. (2003). Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora [*Larrea tridentata* (DC) Coville]. Revista Mexicana de Fitopatología, 21(2), 214-222.
- Ultee, Annemieke; Kets, Edwin P.W.; Alberda, Mark; Hoekstra, Folkert A. and Smid, Eddy J. (2000 a). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. Arch. Microbiol. 174: 233–238.
- Ultee, A.; Slump, R.A.; Steging, G. and Smid E.J. (2000 b). Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. J. Food Prot. 63: 620–624.
- Xu, J.; Zhou, F.; Ji, B.P.; Pei, R.S. and Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol. 47: 174–179.
- Yun, Kyeong W.; Jeong, Hyung J. and Kim, Jong H. (2008). The influence of the growth season on the antimicrobial and antioxidative activity in *Artemisia princeps* var. orientalis. Industrial Crops and Products. 27: 69-74.