

Actividad antibacteriana de los extractos de *Cymbopogon citratus*, *Elionurus* sp. y *Tagetes minuta* contra bacterias que causan mastitis

Antibacterial activity of essential oils of *Cymbopogon citratus*, *Elionurus* sp. and *Tagetes minuta* against bacteria that cause mastitis

MSc. Carolina Lambrecht Gonçalves,^I Dr. Diane Bender Almeida Schiavon,^I MSc. Fernanda Voigt Mota,^I MSc. Angela Faccin,^I MSc. Ryan NoreMBERG Schubert,^I Dr. Gustavo Schiedeck,^{II} Dr. Luiz Filipe Damé Schuch^I

^I Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Pelotas, Brasil.

^{II} Embrapa Clima Temperado. Pelotas, Brasil.

RESUMEN

Introducción: el uso inadecuado de los antimicrobianos es un importante factor de resistencia a estos. En medicina veterinaria, este factor puede influir en el rendimiento de los animales, como en el caso de la mastitis bovina.

Objetivo: evaluar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales e hidroalcohólicos, de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Elionurus* sp. y *Tagetes minuta* L. contra bacterias aisladas de leche bovina.

Métodos: la actividad antimicrobiana de plantas se evaluó utilizando la técnica de microdilución con la determinación de la concentración inhibitoria mínima.

Resultados: los aceites esenciales eran más activos que los hidroalcohólicos, con valores de concentración mínima inhibitoria entre 0,39 y 6,32; 0,10 y 6,32 %; así como de 0,62 a 5 %, para *Cymbopogon citratus*, *Elionurus* sp. y *Tagetes minuta*, respectivamente; mientras que en los extractos hidroalcohólicos, excepto para *Tagetes minuta*, solo se inhibió *Streptococcus uberis* con *Elionurus* sp., pero el extracto hidroalcohólico de *Cymbopogon citratus* no mostró actividad antibacteriana.

Conclusiones: los resultados sugieren el uso de estas plantas como un antimicrobiano natural, que es eficaz sobre bacterias de la mastitis bovina.

Palabras clave: antimicrobiano, leche, plantas bioactivas, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Elionurus* sp., *Tagetes minuta* L.

ABSTRACT

Introduction: the inappropriate use of antimicrobials is a major driver of antimicrobial resistance. In veterinary medicine, this factor can influence on animal performance, as in the case of bovine mastitis.

Objective: this study is aimed to evaluate the antibacterial activity of essential oils and hydroalcoholic of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Elionurus* sp. and *Tagetes minuta* L. and the bacteria isolated from bovine milk.

Methods: the antimicrobial activity of plants was evaluated using the microdilution technique, determining minimum inhibitory concentration values.

Results: the essential oils were more active than the hydroalcoholic, with minimum inhibitory concentration values between 6,32 to 0,39 %; 0,10 and 6,32 %; as well as 0,62 to 5 %, for *Cymbopogon citratus*, *Elionurus* and *T. minuta*, respectively; while EHAs, except for *Tagetes minuta*, only inhibited *Streptococcus uberis* to *Elionurus* sp., being that the hydroalcoholic the *Cymbopogon citratus* showed no antibacterial activity.

Conclusions: these results suggest the use of these plants as natural antimicrobial, being effective against bacteria of bovine mastitis.

Key words: antimicrobial, milk, plant bioactive, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Elionurus* sp. Humb. & Bonpl. ex Willd, *Tagetes minuta* L.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de microorganismos resistentes a los antibióticos convencionales se ha convertido en un problema de salud pública, porque no acompañan a la resistencia de estos organismos evolutivamente.¹

La administración de antimicrobianos a los animales se lleva a cabo con el fin de prevenir y luchar contra las infecciones, además de servir como suplemento alimenticio. Esta práctica se convierte en perjudicial cuando se trata de microorganismos relacionados con la capacidad de infectar a animales y seres humanos, con la posibilidad de transferencia de resistencia a los antimicrobianos.² La mastitis bovina es una condición generalmente de agentes antibacterianos, el tratamiento se basa en la administración de antibióticos. Este procedimiento, cuando se hace de manera incorrecta, permite la presencia de residuos de estas sustancias en la leche materna que ofrecen riesgos para la salud humana,^{3,4} además de la posible contaminación ambiental.⁵

La ineficacia de los tratamientos actualmente aprobados motiva la producción de nuevos medicamentos para combatir estos microorganismos, fomento de la investigación relacionada con los productos naturales.⁶ Así, los estudios que implican el uso de plantas medicinales como el reemplazo antimicrobiano, están diseñados para reducir al mínimo sus efectos para el hombre y los animales. El uso de plantas como medicina alternativa para el tratamiento, la prevención y cura de enfermedades, es una de las más antiguas formas de la práctica médica de la humanidad, que tiene una gran importancia tanto en lo que respecta a los aspectos médicos, como el cultural.⁷ Las plantas de las especies *Tagetes minuta* L., *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., y del género *Elionurus* Humb. & Bonpl. ex Willd.

son popularmente conocidas como chinchillo, hierba-cidro y limoncillo, que están siendo revisadas para su actividad biológica. Los estudios con estas plantas mostraron actividad contra los microorganismos patógenos, como las relacionadas con la mastitis bovina.⁸⁻¹¹

El presente estudio tiene como objetivo comparar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos de las bacterias aisladas de leche bovina.

MÉTODOS

Obtención de extractos de plantas

Las muestras se obtuvieron de las partes aéreas de *T. minuta*, *C. citratus* y *Elionurus* sp. en la estación experimental Cascata-Clima Templado Embrapa, ubicada en las coordenadas geográficas 31°37' S y 52°31' W. Las plantas se secaron a temperatura ambiente, de modo que se obtuvo un contenido de agua inferior o alrededor de 10 %; se mantuvieron en la pantalla, protegidos de la luz solar directa e insectos. Las partes aéreas de las plantas, para obtener los aceites esenciales (AE), se extrajeron por hidrodestilación utilizando el aparato de Clevenger, de acuerdo con la farmacopea brasileña,¹² siendo almacenados en botellas ámbar y refrigeradas. Los extractos hidroalcohólicos (EHA) de las plantas se prepararon utilizando una porción de las hojas a diez partes de alcohol (1:10) a 70 °GL. Las plantas permanecieron durante 15 días en matraces con agitación manual diaria,¹² el extracto se filtró y se sustituyó su volumen inicial con el alcohol. Después el disolvente se eliminó utilizando un evaporador rotatorio a aproximadamente 55 °C bajo 600 mm/Hg, y la presión negativa y el volumen restaurado inicial con agua destilada estéril.¹³

Aislados bacterianos

Los microorganismos ensayados fueron *Staphylococcus coagulasa* positivo (n= 2), *Staphylococcus coagulasa* negativo (n= 2), *Streptococcus uberis* (n= 1), y cepas de referencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) y *Escherichia coli* (ATCC 8739).

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de EHA y AE se evaluó mediante la técnica de dilución en caldo en microplacas, con determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM). Los inóculos se prepararon con una suspensión bacteriana equivalente a 10⁶ ufc/mL. Los EHA se diluyeron sobre la base logarítmica dos en agua en destilada estéril (ADE). Para los AE la dilución se produjo en ADE que contiene 1 % de Tween 20, también sobre la base logaritmo dos. Después de la dilución de los extractos de plantas y de adición de inoculante, los microorganismos se mantuvieron en 37 °C durante 48 h bajo agitación a 75 rpm. Las pruebas se realizaron por triplicado y la CIM se determinó utilizando la media geométrica del inverso de la dilución de extractos de plantas, que no era posible recuperar los microorganismos en la subcultura de agar sangre de una alícuota de cada muestra.^{13,14}

RESULTADOS

Valores de CIM de cada extracto de planta se muestran en la tabla. A pesar de que todas las muestras de plantas presentan actividad antimicrobiana, los AE fueron los resultados más satisfactorios, trabajando en todos los géneros de bacterias. Con la excepción de *C. citratus*, la acción antimicrobiana de EHA se evaluó en las bacterias aisladas, y que *T. minuta* era eficaz contra todas las bacterias grampositivas, mientras que *Elionurus* sp. actuó solo sobre *Streptococcus uberis*.

Tabla. Concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales y los extractos hidroalcohólicos contra las bacterias de la mastitis

Bacteria	Aceite esencial <i>Cymbopogon citratus</i> (%)	Extracto hidroalcohólico <i>Cymbopogon citratus</i> (%)	Aceite esencial <i>Elionurus</i> sp. (%)	Extracto hidroalcohólico <i>Elionurus</i> sp. (%)	Aceite esencial <i>Tagetes minuta</i> (%)	Extracto hidroalcohólico <i>Tagetes minuta</i> (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	6,32	Resistente	6,32	Resistente	4%	Resistente
<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,7	Resistente	6,32	Resistente	5	Resistente
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	3	Resistente	0,31	Resistente	1,25	50
<i>Staphylococcus coagulasa</i> +	0,39	Resistente	0,15	Resistente	0,62	19
<i>Staphylococcus coagulasa</i> +	0,63	Resistente	0,50	Resistente	1,6	50
<i>Staphylococcus coagulasa</i> -	1,5	Resistente	0,15	Resistente	2,5	39
<i>Staphylococcus coagulasa</i> -	2	Resistente	0,10	Resistente	1,95	Resistente
<i>Streptococcus uberis</i>	0,9	Resistente	0,15	6,25	0,75	9,9

El AE de *T. minuta* mostró su mayor eficiencia en comparación con el aislado del de *Staphylococcus coagulasa* positivo y su EHA, con una CIM de 0,62 % y 19 %, respectivamente. En este estudio los valores de CIM para *C. citratus* oscilaron entre 0,39 y 6,32 % de *Staphylococcus coagulasa* positivo y *P. aeruginosa*, respectivamente. Mientras, la variación de CIM del AE de *Elionurus* sp. fue 0,10 % para *Staphylococcus coagulasa* negativo a 6,32 % para *P. aeruginosa* y *E. coli*; y su EHA inhibido con una CIM de 6,25 % para *Streptococcus uberis*.

DISCUSIÓN

Los valores satisfactorios con AE pueden estar relacionados con la mayor concentración de compuestos que se encuentran en estos.¹⁵ Las bacterias gramnegativas, en general, eran menos sensibles a los antimicrobianos que bacterias

grampositivas; un hecho que *Loguercio*¹⁶ atribuye a la constitución estructural de este grupo de bacterias, debido a su contenido en lípidos químicamente más complejo y superior, que obstaculizaría la acción de los productos antimicrobianos.

T. minuta pertenece a la familia Asteraceae y se considera una planta aromática nativa de América del Sur, ampliamente distribuida en Rio Grande do Sul, que se encuentra en el sudeste de los EE. UU. hasta el norte de la Patagonia.^{17,18} La acción antimicrobiana de su AE había sido descrito por *Oyedemi*¹⁹ y otros, contra especies como *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescense* y *Streptococcus pyogenes*. Analizando el tiempo de exposición necesario para inhibir los microorganismos relacionados con la mastitis bovina, *Schuch*⁹ y otros con EHA del *T. minuta*, no encontraron sensibilidad frente a *P. aeruginosa*, sin embargo, como en el presente estudio, *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* se inactivaron completamente en 30 s y 30 min de contacto con EHA, respectivamente.

La caracterización del componente químico de su AE está determinada por factores genéticos, sin embargo, el cambio de la ubicación, la estación, la luz, la temperatura y la parte de la planta a utilizar, pueden influir en su composición y, por lo tanto, su actividad biológica atribuirse a compuestos diferentes.²⁰ Los conflictos respecto a la composición del AE de *T. minuta* se describen en la literatura. *Oyedemi*¹⁹ identificó como un compuesto mayoritario en muestras de esta especie procedentes de Sudáfrica, el 4- careno, 30,1 % de la composición total; mientras que *Chamorro*,¹⁷ Argentina, mediante el análisis del AE extraído de las flores y las hojas ha obtenido los compuestos de la planta β -phelandreno, limoneno, β -ocimeno, dihydrotagetona y tagetenona tagetona, por un total de 90 % de su composición.

Como *T. minuta*, *C. citratus* es bien conocido en las regiones Sur y Sudeste de Brasil, se utilizan en los ornamentos y las prácticas medicinales.²¹ De origen asiático, se distribuye en regiones tropicales y subtropicales. En Brasil recibió numerosas denominaciones como alem, hierba cidro, hierba santa, la caña de azúcar, hierba de limón con aroma.^{22,23} La actividad biológica del AE de *C. citratus* se asigna a su principal componente, el citral.²⁴ Esta especie de planta, analizada por *Nogueira*²⁵ no mostró actividad antimicrobiana, a diferencia de lo observado en este estudio. Sin embargo, *Almeida*²⁶ y otros informaron de la actividad fungistática del EHA del *C. citratus*, lo que sugiere su aplicación como un nuevo tratamiento para la candidiasis oral.

En cuanto al género *Elionurus*, el conocimiento descrito en la literatura con respecto a su acción biológica, la composición química y el cultivo, es aún muy bajo. Tiene una compleja taxonomía, toscos, variables, y con numerosos sinónimos, lo que hace su caracterización.²⁷ En Rio Grande do Sul se conoce como una de las principales gramíneas presentes en los campos altos.¹⁰ Se observó en las muestras de Brasil, la presencia de camfeno, cariofileno, espatulenol, neral y de geranial como principales.^{28,29} A pesar de este limitado conocimiento, la acción antibacteriana de *Elionurus* spp. se puso de manifiesto por *Cacciabua*³⁰ y otros, en el entorno operativo actuado en contra de *S. aureus* y *E. coli*, mientras que su extracto de etanol inhibe *Bacillus cereus*, *P. aeruginosa* ATCC y *S. aureus* ATCC.

En el caso de las plantas que tienen amplia distribución en el territorio brasileño, debe ser considerado el mismo acceso y la difusión del conocimiento de sus propiedades medicinales a la comunidad. Búsquedas relacionadas con estas especies deben llevarse a cabo para proporcionar el uso de productos naturales a los productores de leche, teniendo en cuenta la preocupación por la producción de esta. Por lo tanto, nuevos estudios con la flora local deben fomentarse con el fin de aplicar sus conocimientos y biología.

Los resultados permiten concluir que los extractos de *C. citratus*, *T. minutos* y *Elionurus* sp. demostraron efecto contra las bacterias relacionadas con la mastitis. Así, para el control de la resistencia microbiana, se sugiere su uso como un tratamiento alternativo de enfermedades infecciosas y para reemplazar a los antibióticos convencionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rice LB. Antimicrobial Resistance in Gram-Positive bacteria. Am J med. 2006;119(6):11-9.
2. Nascimento GGF, Maestro V, Campo MSP. Ocorrência de resíduos de antibiótico no leite comercializado em Piracicaba, SP. Rev Nutrição. 2001;14(2):119-24.
3. Costa EO. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. Higiene Alimentar. 1996;10(44):15-7.
4. Albuquerque LMB, Melo VMM, Martins SCS. Investigações sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em Fortaleza-CE-Brasil. Higiene Alimentar. 1996;10(41):29-32.
5. Bila DM, Dezotti M. Fármacos no meio ambiente. Quimica Nova. 2003;26(4):523-30.
6. Freitas G, Costa V, Farias ET, Lima MCA, Sousa IA, Ximenes EA. Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L. Rev Brasileira Farmacognosia. 2002;12(4):64-5.
7. Rezende HA, Cocco MIM. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. Rev Esc Enferm. 2002;36(3):282-8.
8. Leal TCAB, Freitas SP, Silva JF, Carvalho AJC. Produção de biomassa e óleo essencial em plantas de capim cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf] em diferentes idades. Rev Brasileira Plantas Mediciniais. 2003;5(1):61-6.
9. Schuch LFD, Wiest JM, Coimbra HS, Prestes LS, Toni L, Lemos JS. Cinética da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. Ciência Animal Brasileira. 2008;9(1):161-9.
10. Araújo AA. Principais Gramíneas do Rio grande do Sul. Porto Alegre: Sulina; 1971. p. 255.
11. Souza CAS, Avancini CAM, Wiest JM. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Brazilian J Veterinary Research Animal Science. 2000;37(6):152-9.
12. Brasil, Farmacopeia dos estados Unidos do Brasil/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 5ª ed. São Paulo: Siqueira; 2010. p. 546.
13. Prestes LS, Frascolla R, Santin R, Santos MAS, Schram 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):55-61.

14. Oyarzabal MEB, Schuch LFD, Prestes LS, Schiavon DBA, Rodrigues MRA, Mello JRB. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. Rev Cubana Plant Med. 2011;16(3):260-6.
15. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da plantas ao medicamento. Porto Alegre: Ed. UFRGS. 2003. p. 1102.
16. Loguercio AP, Battistin A, Vargas AC, Henzel A, Witt NM. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells. Ciência Rural. 2005;35(2):371-6.
17. Chamorro ER, Ballerinib G, Sequeira AF, Velasco GA, Zalazara MF. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* l. leaves and flowers. J Argentine Chemical Society. 2008;1(2):80-6.
18. Cabrera AL, Klein RM. Flora Ilustrada Catarinense - Compostas, Tribo Senecioneae. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues; 1975. p.125-222.
19. Oyedemi SO, Pirochenva G, Mabinya LV, Bradley G, Afolayan AJ. Compositions and comparisons of antimicrobial potencies of some essential oils and antibiotics against selected bacteria. African J Biotechnology. 2008;7(22):4140-6.
20. Morais LAS. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. Horticultura Brasileira. 2009;27(2):4050-63.
21. Vida JB, Júnior AAC, Verzignassi JR. Primeira ocorrência de ferrugem em capim-limão causada por *Puccinia cymbopogonis* no Brasil. Summa Phytopathology. 2006;32(1):89-91.
22. Gomes EC, Negrelle RRB. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. Visão Acadêmica, Curitiba. 2003;4(2):137-44.
23. Gupta BK, Jain N. Cultivation and utilization of Genus *Cymbopogon* in Indian. Indian Perfumer, 1978;22(2):55-68.
24. Guerra MJM, Badell JB, Albajes ARR, Pérez HB, Valencia RM, Azcuy AL. Evaluación toxicológica aguda de los extractos fluidos al 30 y 80 % de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. (Caña Santa). Rev Cubana Plant Med. 2000;5(1):97-101.
25. Nogueira JCR, Diniz MFM, O EL. Atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos vegetais em otite externa aguda. Rev Brasileira Otorrinolaringologia. 2008;74(1):118-24.
26. Almeida RBA, Carretto CFP, Santana RS, Furlan MR, Junqueira JC, Gomes AOC, et al. Atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf sobre *Candida* spp. Rev Odontologia UNESP. 2008;37(2):147-53.
27. Longhi-Wagner HM. Flora fanerogâmica do estado de São Paulo (Poaceae). São Paulo: Hucitec; 2001. p. 292.
28. Scramim S, Saito ML. Essencial oil *Elinurus muticus* (Sprengel) O Kuntze (Gramineae). J Essential Research. 2000;12(1):298-300.

29. Heydorn S, Menné T, Andersen KE, Bruze M, Svedman C, White IR, et al. Citral, a fragrance allergen and irritant. Contact dermatitis. 2003;49(1):32-6.

30. Cacciabua M. *Elionurus muticus* from North of Argentina: Evaluation of the antibacterial activity of three essential oil chemotypes. Biocell. 2005;29(2):223.

Recibido: 2 de agosto de 2012.
Aprobado: 10 de marzo de 2013.

Carolina Lambrecht. Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Pelotas, Brasil.
Correo electrónico: carolina_lamg@yahoo.com.br