

Estudio de la actividad antibacteriana del aceite esencial de los rizomas de *Curcuma longa* L.

¹Eugenio Torres R., ¹Rogelio Moreno S., ¹Yosvel Tamayo V., ¹Robinson Herмосilla E., ²Zonia Guillén G.

¹Centro de Estudio de Química Aplicada. Universidad de Granma. Bayamo. Cuba.

²Universidad de Ciencias Pedagógicas. Blas Roca Calderío. Manzanillo, Granma. Cuba

*Correo electrónico: etorresrodriguez@udg.co.cu

Resumen

La *Curcuma longa* L. es una planta que se encuentra en estado silvestre en las zonas montañosas de las regiones oriental y occidental de Cuba, cuyos rizomas son ricos en aceite esencial. El propósito de este trabajo es evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial extraído de los rizomas de *Curcuma longa* L. Se probaron diversos métodos para la extracción del aceite esencial de los rizomas de la planta, siendo la hidrodestilación el más eficiente. El aceite obtenido fue evaluado frente *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, mostrando actividad antibacteriana frente a las cuatro especies estudiadas, siendo más promisorio su acción frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* con CBM de 32 y 8 respectivamente.

Palabras clave: *Curcuma longa* L., hidrodestilación, actividad antibacteriana

Study of antibacterial activity of essential oil from rhizomes of *Curcuma longa* L.

Abstract

Curcuma longa L. is a plant that is found in wild state in the mountainous areas of eastern and western regions of Cuba whose rhizomes are rich in essential oil. The purpose of this work is to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil present in the rhizomes of *Curcuma longa* L. Diverse methods were tested for the extraction of the essential oil of the plant rhizomes. The hydrodistillation was the most efficient. The obtained oil was evaluated in front of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, showing antibacterial activity against four species, being more effective against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* with CBM of 32 and 8 respectively.

Key words: *Curcuma longa* L., hydrodistillation, antibacterial activity

Introducción

La *Curcuma longa* L. es una planta que se encuentra en estado silvestre en las zonas montañosas de las regiones oriental y occidental de Cuba y aparece además ocasionalmente en las parcelas de algunos campesinos (1). A la misma se le atribuyen propiedades antioxidantes (2), hepatoprotectoras (3), anticancerígenas (4) y quimioprotectoras (5). En los rizomas de la planta se encuentra un aceite esencial en un 2,44 % (6), constituido por una mezcla de terpenos y turmerona como componentes mayoritarios, lo que le confiere potencial actividad antimicrobiana (7, 8).

Datos farmacoepidemiológicos recientes (9), sugieren que la efectividad de los agentes antimicrobianos disponibles en los servicios de salud ha disminuido, incluso, en varios círculos científicos y académicos se señala la preocupación por el advenimiento de la denominada "era postantibiótica", además de la pérdida gradual de las habilidades orgánicas para detectar, contener y prevenir enfermedades emergentes. A esta situación se suma el incremento de infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos, lo que ha dado lugar a la necesidad de terapias más efectivas para combatir estos agentes patógenos, otrora benignos (10).

Teniendo en cuenta la necesidad de encontrar nuevos agentes antibacterianos y la posibilidad de emplear el aceite esencial de *Curcuma longa* L. como bactericida natural, en este trabajo se planteó como objetivo: evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial extraído de los rizomas de *Curcuma longa* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la identificación de la planta se herborizó un ejemplar representativo que fue depositado en el Departamento de Ingeniería Forestal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma, Cuba, con la identificación UDG H 012. La biomasa se recolectó de forma aleatoria en canteros pertenecientes al centro de estudio de Biotecnología vegetal de la Universidad de Grama, Cuba, a las 9:00 a.m. del 6 de marzo de 2013, a una temperatura de 24 °C y fue clasificada con el objetivo de eliminar la parte del material que no reunía las condiciones óptimas para el estudio. Los rizomas de *Curcuma longa* L. frescos y previamente tratados con hipoclorito de sodio (1 %) fueron cortados y triturados. 240 g de masa vegetal preparada, fueron sometidos a hidrodestilación en un aparato constituido por una balón con calentamiento y condensador acoplado, en el balón con calentamiento se colocó la masa vegetal y 500 mL de agua destilada. El aceite esencial fue recogido en otro balón (recipiente colector) en el que se añadieron 100 mL de diclorometano. La mezcla de aceite, diclorometano y agua colectada fue separada en un embudo, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, después de filtrar. El diclorometano fue separado del aceite por evaporación al vacío, a una temperatura de 40 °C y presión de 5 mbar (500 Pa) durante 30 min, lo que garantizó la total eliminación del disolvente. La pureza del aceite fue determinada por cromatografía de capa fina

en cromatofolios (Al) de gel de sílice 60 F 254 con espesor de capa 0,2 mm (Merck). La visualización de las placas se efectuó en lámparas de UV (Typ NU-8KI, l: 254 nm).

El aceite extraído fue evaluado frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 57853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se empleó el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco (*Bauer-Kirby*) para bacterias y el método de diluciones seriadas dobles en caldo. Se emplearon discos de antibióticos comerciales (Sensi-Disc™, Francia), ampicilina 30ug/ml. Se prepararon soluciones *stock* a una concentración final de 6 µg/µL y se aplicaron 5 µL en discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro. La concentración final de los compuestos químicos en los discos fue de 30 µg/disco. Como control negativo se emplearon discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro cargados con 5 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), que fue el solvente empleado en la preparación de las soluciones a evaluar.

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) a los compuestos que mostraron actividad antimicrobiana por el método de *Bauer-Kirby* al inhibir el crecimiento de alguna de las bacterias evaluadas. Las disoluciones de los compuestos se prepararon a una concentración dos veces mayor que la máxima concentración a definir en el momento del ensayo. Se prepararon soluciones *stock* de 2048 µg/mL en DMSO. Se depositaron 100 µL de medio de cultivo caldo Mueller-Hinton (Biolife, Italia) (pH 7,3 ± 0,2) para bacterias en los 96 pocillos de las placas (Falcon, EEUU). De cada solución *stock* se añadieron 100 µL en los tres primeros pocillos (tres réplicas) y se mezclaron vigorosamente mediante pipeteo. Se tomaron 100 µL de esta mezcla y se pasó a la segunda fila de tres pocillos repitiéndose el procedimiento hasta llegar al antepenúltimo trío de pocillos. De esta forma, en los primeros pocillos se encuentra la mayor concentración del antimicrobiano, la que va disminuyendo al doble en el resto de los pocillos. La mínima concentración inhibitoria se define como la mínima concentración que inhibe completamente (a simple vista) el crecimiento del microorganismo (11).

Para la determinación de la concentración bactericida mínima CBM se tomaron con una micropipeta 100 µL de cada tubo de las concentraciones de ensayo donde no se observó crecimiento visible y se añadieron en la superficie de tres placas con medio agar Mueller-Hinton (Biolife, Italia) (pH 7,3 ± 0,2) sembradas con los correspondientes cultivos bacterianos. Para lo cual el inóculo se distribuyó con espátulas de Drigalsky sobre la superficie del agar. Después de un reposo de 15-30 min las placas se incubaron a 37,0 ± 0,5 °C por un período de 16-18 h, en una incubadora (Sartorius, China). Transcurrido el tiempo de incubación se procedió al conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando un contador de colonias. La Concentración Letal Mínima (CLM) fue definida como la menor concentración de la sustancia de ensayo que mata el 99,9 % del inóculo inicial. Un conteo de viables ≤ 10 UFC fue indicativo de un efecto bactericida (11).

RESULTADOS

La hidrodestilación al ser un método más drástico, permite el calentamiento directo de la masa vegetal en medio acuoso, con la posterior separación de los componentes volátiles que son trasladados por el vapor de agua y recogidos en un disolvente apropiado (diclorometano), lo que garantiza una alta eficiencia. El secado del aceite con sulfato de sodio anhidro y su posterior evaporación al vacío permitieron eliminar el agua y el disolvente lo que condujo a la obtención de un aceite con comprobada pureza cromatográfica (Figura 1).



Figura 1. Cromatografía de capa fina del acetite esencial en tolueno-acetato de etilo (5:1).

Mediante hidrodestilación se realizaron cinco extracciones del aceite esencial a partir 240 g de los rizomas de *Curcuma longa* L. (Tabla 1), obteniéndose 2,70 g de un líquido amarillo pálido para un 1,09 % de rendimiento.

Tabla 1. Resultados de las extracciones mediante hidrodestilación.

Extracciones	Masa vegetal(g)	Tiempo(h)	Masa de Aceite (g)	Rdto (%)
1	246	3	2,80	1,1383
2	246	3	2,60	1,0569
3	246	3	2,75	1,1178
4	246	3	2,65	1,0772
5	246	3	2,70	1,0975
\bar{X}	246	3	2,70	1,0975

\bar{X} : Media; Rdto: Rendimiento

Se realizó un estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial obtenido frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Tabla 2), observándose actividad antibacteriana en todos los casos.

Tabla 2. Resultados de la pruebas biológicas.

Compuesto (µg/mL)	<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Curcumina	>128	>128	128	>128	64	112	68	124
A.Esencial	128	128	32	64	8	32	4	8
DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilina	12,5	16,7	8,,3	11,13	1,56	3,52	1,56	2,23

CIM: concentración inhibitoria mínima; CBM: concentración bactericida mínima.

DISCUSIÓN

Mediante arrastre con vapor no fue posible extraer el aceite esencial de los rizomas de *Curcuma longa* L., lo que se explica debido a la alta temperatura de ebullición del mismo, que le confiere el alto contenido de turmerona (Asghari et al., 2009). Sin embargo la hidrodestilación permitió una extracción efectiva y reproducible como lo demostró el comportamiento similar en las cinco extracciones realizadas mostradas en la Tabla 1.

El aceite esencial obtenido mostró actividad antibacteriana frente a las cuatro cepas estudiadas, resultando más potente que la curcumina.

El empleo de ampicilina como control positivo responde a que este antibiótico es considerado como uno de los fármacos automedicados por la población cubana, por otra parte la solubilidad del ampicilina en agua permite preparar las diferentes diluciones en un solvente inocuo que no interfiere con los resultados.

La mayor actividad del aceite se observó frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* con CBM de 32 y 8 respectivamente (Tabla 2). Este resultado puede explicarse debido a su alto contenido de monoterpenos y turmerona (12). Resulta interesante la actividad bactericida mostrada por el aceite esencial frente a bacterias Gram-positivas lo que puede constituir un punto de partida en la búsqueda de nuevos antibióticos naturales, efectivos contra bacterias Gram-positivas.

Los resultados alcanzados son muy tentativos, por cuanto sugieren que es posible emplear este aceite esencial para el tratamiento de enfermedades causadas por cepas de *Staphylococcus aureus* patógenas. *Bacillus subtilis* no constituye una bacteria de interés patogénico, sin embargo, en esta investigación fue empleada como modelo biológico de referencia para los gérmenes Gram-positivos en general; ya que en ocasiones esta bacteria se considera modelo como lo es *Escherichia coli* para el caso de las bacterias Gram-negativas (13).

CONCLUSIONES

El aceite esencial contenido en los rizomas de *Curcuma longa* L. puede ser extraído eficientemente mediante hidrodestilación sin necesidad de secar previamente la masa vegetal. El aceite esencial de rizomas de *Curcuma longa* L. mostró actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* siendo más promisorio frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, con CBM de 32 y 8 respectivamente.

REFERENCIAS

1. **Espinosa A, Silva J, Borges M, González O, Pérez J, Fajardo L.** (2012) Evaluación de plantas de *Curcuma longa* L. obtenidas por cultivo de tejidos en condiciones de organopónico. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14: 196-202.
2. **Cousins M, Adelberg J, Chen F, Rieck J.** (2007). Antioxidant capacity of fresh and dried rhizomes from four clones of turmeric (*Curcuma longa* L.) grown *in vitro*. [Versión electrónica]. *Industrial Crops & Products*. 25: 129-135.
3. **Medina A, García R, Ramos, L.** Efecto antihepatotóxico de la *Curcuma longa*. Extraído el 23 de febrero del 2012 de www.ilustrados.com/publicaciones/EEF.
4. **López-Lazaro M.** (2008) Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: Considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent *Molecular Nutrition and Food Research*. 52: S103 – S127.
5. **Anand P, Thomas SG, Jaikumar A, Kunnumakkara B, Sundaram C, Kuzhuvilil B. Harikumar , Sung B , et al.** (2008) Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochemical Pharmacology* 76: 1590–1611.
6. **Mesa M, Ramírez-Tortosa M C, Aguilera CM, Ramírez-Boscá A, Gil A** (2000) Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los cucuminoides. *Ars Pharmaceutica*. 41: 307-321.

7. **Asghari G, Mostajeran A, Shebli M** (2009) Curcuminoid and essential oil components of turmeric at different stages of growth cultivated in Iran. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 4: 55-61.
8. **Kalemba, D, Kunicka** (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 10: 813-29.
9. Muñoz García P Ma, Peláez García T, Alcalá Hernández L, Bouza Santiago E. (2006) Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas-VIH. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.
10. **Franklin TJ, Snow GA**. Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action. Sixth edition. Springer Science-I-Business Media, Inc. (2005). 29-98.
11. **Mathew A. Vilker, Franklin C. Cockerlill, Karen Bush, Michael N.Dudley, George M. Eliopoulus, Dwight J. Hardy, et al.** (2009). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI document M100-S19. Wayne Pa: CLSI.
12. **Tripathi AK, Prajapati V, Verma N, Bahl NJ, Bansal RP, Khanuja SPS, Kumar,S** (2002) Bioactivities of the Leaf Essential Oil of Curcuma Longa On Three Species of Stored-Product Beetles (Coleoptera). *Journal of Economic Entomology*. 95: 183-189.
13. **Tan M, Zhou L, Huang Y, Wang Y, Hao X, Wang J** (2008). Antimicrobial activity of Globulol isolated from the fruits of Eucalyptus globulus Labill. *Natural Products Research*. 22: 569-575.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 13, Agosto 2014

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar