

# ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.)

## ANTI-MICROBIAL ACTIVITY OF THYME ESSENTIAL OIL (*Thymus vulgaris* L.)

López-Ambrocio, R.M.<sup>1</sup>; Ruiz-Posadas, L.M.<sup>2\*</sup>; Delgadillo-Martínez, J.<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup>Programa de Botánica, <sup>3</sup>Programa de Microbiología, Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México.

\*Autor responsable: lucpo@colpos.mx

### RESUMEN

El tomillo (*Thymus vulgaris* L.) se comercializa principalmente por sus hojas y por la extracción de su aceite esencial (AE), compuesto principalmente por monoterpenos (timol, carvacrol y linalol,  $\gamma$ -terpineno, p-cimeno,  $\alpha$ -Pino y  $\alpha$ -Tujeno). Se conocen diversas propiedades del AE, tales como su actividad antitumoral, antibacteriana, antifúngica y antioxidante. Se evaluó el efecto que tiene la aplicación de un fitorregulador comercial, la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares en el rendimiento, composición y actividad antibacteriana del aceite esencial de tomillo, obteniendo que el mayor rendimiento lo registró el tratamiento P61 con 13.3 mg AE g<sup>-1</sup> MS. Se observó que el número de componentes y el porcentaje presente en el AE son diferentes en cada tratamiento. El tratamiento que presentó mayor concentración de timol fue el Testigo (52.55%), seguido por el tratamiento inoculado con P61 (51.05%) y Zac19+Cedro (50.66%). Para O-Cimeno el tratamiento inoculado con Zac19 (21.79) presenta la mayor concentración, seguido de Zac19+Cedro y Bioforte con 20.38% y 19.37% respectivamente. Respecto a la concentración de  $\gamma$ -terpineno Cedro y P61 mostraron mejor respuesta, con 17.91 y 17.84% respectivamente. Los aceites de *T. vulgaris*, mostraron actividad antibacteriana contra *E. coli*, en concentración a 50%, correspondiendo a plantas inoculadas con P61 que demostró mayor diámetro de inhibición.

**Palabras clave:** tomillo, aceite esencial, micorriza arbuscular, rizobacterias.

### ABSTRACT

Thyme (*Thymus vulgaris* L.) is marketed primarily for its leaves and the extraction of its essential oil (EO), composed mainly by monoterpenes (thymol, carvacrol and linalool,  $\gamma$ -terpinene, p-Cymene,  $\alpha$ -Pinen, and  $\alpha$ -Tujene). Various properties of the EO are known, such as its antitumor, antibacterial, antifungus and antioxidant activities. The effect on the yield, composition and antibacterial activity of the thyme essential oil of applying a commercial phyto regulator, and inoculating with plant growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizic fungi was evaluated, finding that the highest yield was recorded with the P61 treatment with 13.3 mg EO g<sup>-1</sup> MS. It was observed that the number of components and the percentage present in the EO are different in each treatment. The treatment that presented highest thymol concentration was the control (52.55 %), followed by the treatment inoculated with P61 (51.05 %) and Zac19+Cedar (50.66%). For p-Cymene, the treatment inoculated with Zac19 (21.79) presents the highest concentration, followed by Zac19+Cedar and Bioforte with 20.38% and 19.37%, respectively. Regarding the concentration of  $\gamma$ -terpinene, cedar and P61 showed a better response, with 17.91 and 17.84%, respectively. The *T. vulgaris* oils showed antibacterial activity against *E. coli*, in a concentration of 50 %, corresponding to plants inoculated with P61 which demonstrated a larger inhibition diameter.

**Keywords:** thyme, essential oil, arbuscular mycorrhizae, rhizobacteria.

**Agroproductividad:** Vol. 9, Núm. 11, noviembre. 2016. pp: 78-82.

**Recibido:** febrero, 2016. **Aceptado:** octubre, 2016.



## INTRODUCCIÓN

El aceite esencial (AE) de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) está compuesto principalmente por monoterpenos oxigenados (timol, carvacrol y linalol) y monoterpenos hidrocarbonados ( $\gamma$ -terpineno, p-cimeno,  $\alpha$ -Pineno y  $\alpha$ -Tujueno) también puede contener ésteres acéticos, cetonas y aldehídos (Rota *et al.*, 2008; Ghasemi *et al.*, 2013). El tomillo ha sido muy utilizado y recomendado desde la antigüedad. Comúnmente se usa como té de hierbas, condimento y para diversos fines medicinales, esta propiedad se atribuye a el AE de sus hojas; se usa como tónico, carminativo, digestivo, antiespasmódico, antimicrobiano, antioxidante, antiviral, antiinflamatorio, sedante y expectorante. El AE de tomillo presenta actividad antitumoral, antibacteriana (frente a gram positivas y gram negativas), posee propiedades antifúngicas y antioxidantes (Muñoz, 202; El-Nekeety *et al.*, 2011). Las principales industrias que demandan el AE de tomillo son la farmacéutica, cosmética, veterinaria, agroalimentaria, avícola y ganadera. Las cualidades del AE de tomillo se deben principalmente a sus componentes: timol y carvacrol. El timol que conforma 50% del AE de tomillo, ha sido reportado como potente agente antimicrobiano, capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias, debido a que se une a las membrana bacteriana de manera hidrofóbica por puentes de hidrógeno, lo que causa perturbaciones en la membrana, incrementando la permeabilidad, que conducen a la pérdida de iones de potasio y ATP intracelular, y finalmente la muerte celular. También se ha reportado que el timol inhibe la germinación de esporas, el crecimiento y multiplicación celular en bacterias (Alonso, 2004; García *et al.*, 2008; Nikolic *et al.*, 2014).

El carvacrol es un isómero del timol, cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo, su mecanismo de acción es semejante al del timol. Este componente interactúa con la membrana celular disolviéndose en la bicapa fosfolipídica, lo que causa la desestabilización de la misma, aumentando su fluidez y la permeabilidad. La posición orto de su radical hidroxilo le permite actuar como intercambiador de protones, primero se difunde a través de la

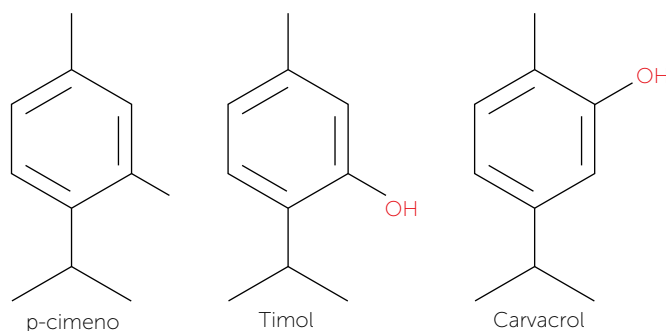
membrana hacia el citoplasma donde libera su protón, posteriormente vuelve al exterior de la célula transportando y liberando un catión (por ejemplo ion-potasio), y el carvacrol capta un nuevo catión repitiendo el ciclo, causando agotamiento de ATP, deterioro de procesos vitales y finalmente la muerte de la célula bacteriana. También se ha reportado que el carvacrol afecta la síntesis de componentes estructurales, inhibiendo la producción de flagelos en *E. coli* (García *et al.*, 2008). Algunos trabajos reportan que la fuerte acción antimicrobiana del timol y carvacrol se atribuye a la presencia del

radical hidroxilo, debido a que p-cimeno (Figura 1), precursor biológico de estos componentes carece de este hidroxilo y presenta menor actividad. El AE de tomillo comprende una amplia gama de aplicaciones, la industria farmacéutica lo usa para la elaboración de medicamentos por sus propiedades funcionales (Ortuno, 2006; CBI, 2014).

*Escherichia coli* es una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa y crece de manera óptima bajo condiciones aeróbicas a 37 °C; es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales, la mayoría de las cepas son inofensivas, sin embargo, las cepas patógenas causan una variedad de enfermedades, incluyendo gastroenteritis, disentería, síndrome urémico hemolítico, infección del tracto urinario, septicemia, neumonía, y meningitis (Meng *et al.*, 2007; Leggett *et al.*, 2012). Con base al factor de virulencia y enfermedades que causan, las cepas patógenas de *E. coli* se clasifican en seis

subgrupos distintos: *E. coli* adhesión-difusa (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigena (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Meng *et al.*, 2007). La infección por *E. coli* se transmite a los seres humanos

principalmente a través del consumo de alimentos contaminados, tales como carne cruda o poco cocida, leche cruda, contaminación fecal del agua y vegetales. Su importancia como problema de salud pública fue reconocida en 1982, a raíz del brote en los Estados Uni-



**Figura 1.** Estructura química de p-cimeno, timol y carvacrol (Chizzola, 2013).

dos de América. Los síntomas de la enfermedad incluyen cólicos y diarrea, que puede ser sanguinolenta. También pueden aparecer fiebre y vómitos. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de 10 días, aunque en algunos casos la enfermedad puede causar la muerte (Leggett *et al.*, 2012). La principal preocupación en los últimos años ha sido el un creciente número de brotes de EHEC, esta cepa causa diarrea con sangre y síndrome urémico hemolítico, se ha aislado de las heces de gaviotas pollo, cabras, ovejas, cerdos, perros y gatos. La mayoría de las infecciones se originan por comer carne de vacuno cruda, leche y queso no pasteurizado (Meng *et al.*, 2007, OMS, 2105).

Esta enfermedad es prevalente en los países desarrollados, ha sido implicada en muchos brotes en los EE.UU., Europa y Canadá. En 1993, hubo un brote en EE. UU. afectando a más de 500 personas y causando cuatro muertes, y a finales de 2006, hubo importante brote involucrando espinacas (*Spinacia oleracea* L.) y lechuga (*Lactuca sativa* L.), la enfermedad afectó a 199 y provocó tres muertes. También en Alemania en el 2011 se informó de un brote epidémico producido por EHEC, se trataron cerca de 3255 casos, según la OMS, con 33 fallecidos. La cepa de la bacteria aparecida en Alemania es resistente a ocho tipos de antibióticos, tales como la penicilina, sulfamida, cefalotina o la estreptomycin (Leggett *et al.*, 2012; OMS, 2015); por lo que es importante buscar otras alternativas para su control. Aunado a lo anterior, la necesidad de la exclusión o eliminación de microorganismos patógenos, la aparición bacterias resistentes a los antibióticos y la tendencia en la sustitución

de conservantes sintéticos ha impulsado la investigación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. Con base a lo anterior, se evaluó el efecto antimicrobiano del aceite esencial de tomillo en busca de alternativas naturales para el control de *E. coli*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5-Alpha (*E. coli* DH5a), y se activó colocando 15 mL de caldo nutritivo (Merck) en un matraz Erlenmeyer y se cubrió con papel aluminio, para esterilizarlo en una olla de presión a 18 lb plg<sup>-2</sup> por 18 minutos. Dentro de una campana laminar, el caldo nutritivo se vertió en un tubo tipo Falcón. Utilizando una asa esterilizada a la llama y enfriada, se tomó una asada de la cepa *E. coli* (DH5a) y se vertió en el tubo, el cual se colocó en una incubadora con agitación rotatoria (Thermo Scientific Max Q200) a 37 °C con 110 rpm durante 24 h. Para extraer el caldo nutritivo, el tubo se centrifugó a 7,000 rpm durante 15 min (centrifuga SIGMA), después se retiró la alícuota y se agregaron 15 mL de agua destilada previamente esterilizada; el pellet y el agua destilada se mezclaron con la ayuda de un vórtex y centrifugó nuevamente. Este proceso se repitió tres veces.

### Material Vegetal

El AE se obtuvo por el método de arrastre de vapor de plantas de tomillo inoculadas con hongos micorrizicos arbusculares, rizobacterias promotoras del crecimiento y un fitorregulador de crecimiento comercial. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) inóculo del consorcio de HMA Zac19\*, 2) inóculo del consorcio de HMA Cedro\*, 3) inóculo del consorcio de HMA Zac19 con inóculo del consorcio de HMA Cedro\*, 4) cepa de *Paenibacillus polymyxa* (P61) (\*cepas de referencia del Área de Microbiología), 5) fitorregulador de crecimiento comercial Bioforte. 6) testigo (López-Ambrocio *et al.*). Se utilizó un diseño completamente al azar, cuatro concentraciones de AE por tratamiento (0%, 15%, 20% y 50%). Las pruebas se hicieron por triplicado y con tres repeticiones.

### Bioensayos

La actividad antibacteriana del AE de tomillo frente a *E. coli* (DH5a) se evaluó mediante el método de difusión de disco en agar. Se preparó agar (Merck), se esterilizó y se repartió en cajas Petri. Posteriormente en una campana de flujo laminar se preparó el inóculo bacteriano estandarizado en  $1 \times 10^9$  células mL<sup>-1</sup> de la cepa *E. coli* (DH5a). De este inóculo se vertieron 10  $\mu$ L en cada caja Petri y con una varilla de vidrio esterilizada a la llama se estrió en un patrón radial. El AE de cada tratamiento se diluyó con diclorometano a diferentes concentraciones de 0%, 15%, 20% y 50%. Después en el centro de las cajas Petri se colocó un disco de papel de filtro Whatman Núm. 1 esterilizado de 10 mm de diámetro previamente saturado con 10  $\mu$ m de la concentración correspondiente de AE. Se utilizó ampicilina como testigo positivo en concentraciones de 0%, 15%, 20% y 50%. Las cajas se incubaron a 37 °C por 24 h en una incubadora Thermo Scientific Max Q200. Se colocaron de tal manera que la tapa quedara hacia abajo para evitar que gotas de agua condensada puedan caer sobre los microorganismos y dispersen su crecimiento.

**VARIABLES EVALUADAS**

**Diámetro de inhibición:** Con un vernier se midió la zona de inhibición de crecimiento de *E. coli* (DH5a) que rodea al disco, la cual incluyó el diámetro del disco de papel. Los resultados se expresan en mm.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

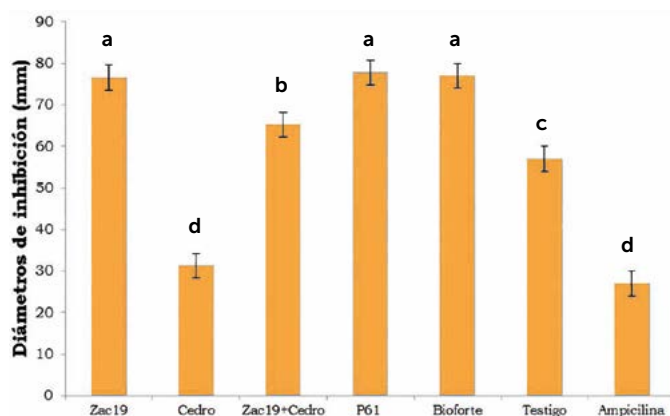
Los resultados se analizaron para cada tratamiento y el análisis de varianza se hizo con el modelo lineal general, y cuando hubo diferencias se aplicó la prueba de diferencia mínima significativa (DMS, 0.05). Se utilizó el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2002).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Diámetro de inhibición**

Los aceites de *Thymus vulgaris* L. mostraron tener un gran potencial de la actividad antibacteriana contra *E. coli*. (Cuadro 1), ya que según Uzel *et al.* (2004) las zonas de inhibición  $\geq 3$  mm se consideran como de alta actividad. La dilución diferentes diluciones de AE mostraron diferencia significativa en el diámetro de inhibición, la concentración que demostró tener mejor efecto fue al 50% (Cuadro 1). En la concentración al 50% los tratamientos tuvieron diferencias significativas (Figura 2); el tratamiento con mayor diámetro de inhibición correspondió a las plantas inoculadas con P61; en contraste el tratamiento con menor diámetro de inhibición fue el testigo. En el análisis del AE por cromatografía de gases se observó que en cada tratamiento la composición del AE es diferente. El efecto antibacteriano del AE está relacionado con sus componentes, el timol conforma de 40% a 53% del total, y ha sido reportado por varios autores como un potente agente antimicrobiano; este compuesto es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias. También se ha reportado que el timol inhibe la germinación de esporas, el crecimiento y multiplicación celular en bacterias (Alonso, 2004; García *et al.*, 2008; Nejad *et al.*, 2008; Nikolic *et al.*, 2014).

También se considera la sinergia de los componentes menores del aceite, así como una posible interacción. Otros constituyentes, tales como C-terpineno han demostrado ejercer buena actividad debido a su posible sinérgica o efectos antagónicos. El monoterpeno hidrocarbonado p-Cimeno (precursor biológico del timol) es hidrofóbico y causa turgencia en la membrana citoplasmática, esta sustancia no es tan efectiva cuando se usa sola, pero cuando es combinada con Carvacrol se ha registrado sinergismo (Rosas *et al.*, 2011). Se ha observado que la sinergia de los componentes inhibe distintas rutas bioquímicas y enzimas. Los componentes de los AE también pueden actuar sobre las proteínas que se encuentran embebidas en la membrana citoplasmática. Hay estudios que demuestran los efectos antibacterianos de eugenol y carvacrol en *E. coli*, los resultados demuestran disminución del potencial de membrana al exponer las células microbianas a estos compuestos (Ennomoto *et al.*, 1991). Burt *et al.* (2007) señalaron que las células de *E. coli* crecen en presencia de carvacrol a una concentración de 1mM pero se inhibe la síntesis de flagelos provocando que el microorganismo crezca sin movilidad.



**Figura 2.** Actividad antibacteriana del AE al 50% de *Thymus vulgaris* L. en *Escherichia coli* DH5-Alpha en función de los diámetros de inhibición del crecimiento de la bacteria (mm  $\pm$ DMS; n=9). Medias con letras iguales no fueron significativamente diferentes (DMS, 0.05).

**Cuadro 1.** Actividad antibacteriana del AE de *Thymus vulgaris* L. en *Escherichia coli* DH5-Alpha en función de diámetros de inhibición del crecimiento de la bacteria (mm  $\pm$ error estándar; n=9).

Concentración (mg mL <sup>-1</sup> )	Tratamientos						
	Zac19	Cedro	Zac19+Cedro	P61	Bioforte	Testigo	Ampicilina
15	25.2 c ( $\pm$ 2.3)	11.3 b ( $\pm$ 0.5)	31.3 b ( $\pm$ 1.9)	35.1 c ( $\pm$ 0.8)	34.1 c ( $\pm$ 1.3)	27.0 c ( $\pm$ 1.2)	27.1 a ( $\pm$ 1.1)
20	68.4 b ( $\pm$ 1.4)	33.0 a ( $\pm$ 1.1)	64.8 a ( $\pm$ 1.5)	46.3 b ( $\pm$ 1.6)	72.5 b ( $\pm$ 2.2)	39.0 b ( $\pm$ 2.3)	26.4 a ( $\pm$ 0.85)
50	76.5 a ( $\pm$ 1.7)	31.3 a ( $\pm$ 1.4)	65.2 a ( $\pm$ 1.4)	77.7 a ( $\pm$ 1.1)	77.0 a ( $\pm$ 1.5)	57.0 a ( $\pm$ 1.2)	27.0 a ( $\pm$ 1.0)

Medias con letras iguales en una columna no fueron significativamente diferentes (DMS, 0.05). El diámetro del testigo fue 10 mm.

## CONCLUSIONES

Se demostró que el AE de tomillo tiene potencial para ser utilizado en el control de *E. coli*.

## LITERATURA CITADA

- Alonso J. 2004. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. Editorial Corpus. Argentina. 1350 p.
- Chizzola R. 2013. Natural Products. KG Ramawat, Mérillon JM. Regular Monoterpenes and Sesquiterpenes (Essential Oils). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2973-3003.
- El-Nekeety A, Mohamed S, Hathout A, Hassan N, Aly S, Abdel-Wahhab M. 2011. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induce oxidative stress in male rats. *Toxicol* 57: 984-991.
- García RM, Paulo E. 2008. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería en alimentos* 2-2:41-51.
- CBI. 2014. Tradewatch natural colours, flavours and thickeners. Disponible en <http://www.cbi.eu/disclaimer>.
- Ghasemi A, Hashemib M, Taherian F. 2013. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* 48: 43- 48.
- Leggett H, Cornwallis C, West S. 2012. Mechanisms of Pathogenesis, Infective Dose and Virulence in Human Parasites. Springer New York.
- López-Ambrocio, R.M., Ruiz-Posadas L.M., Delgadillo-Martínez, J. 2015. Rendimiento y calidad de *Thymus vulgaris* L., por efecto de hongos micorrízicos, rizobacterias y fitoreguladores. *Agro Productividad* (8):3-11.
- Meng L, Schroeder C. 2007. *Escherichia coli*. En Simjee S. Infectious Disease: Foodborne Diseases. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 132 p.
- Muñoz F. 2002. Plantas medicinales y aromáticas; estudio, cultivo y procesado. España: Mundi-Prensa. 365 p.
- Nikolić M, Glamoclija J, Ferreirab I, Calhelhab R, Fernandesb A, Markovicc T, Markovicd D, Giwelie A, Sokovica M. 2014. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumoractivity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products* 52:183- 190.
- OMS. Mayo 2015. Disponible en [www.who.int](http://www.who.int).
- Ortuño M. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ediciones AIYANA. España. 274 p.
- Rosas A, López A. 2011. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*). *Temas selectos de ingeniería en alimentos* 5-1:41-50.
- Rota M, Herrera A, Martínez R, Sotomayor J, Jordán M. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* 19: 681-687.

