

Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario

Herrera Arias F. C, García - Rico R. O.

Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología, Universidad de Pamplona. Grupo de Investigación en Ciencias Aplicadas (GICA - UP)

Email: fannyh@unipamplona.edu.co

Recibido 15 Agosto de 2006

Aceptado 17 Octubre 2006

ABSTRACT

The inhibitory effect of aqueous extracts of cinammon, cloves, laurel and thyme was evaluated on five pathogenic bacterial strains of : *E. coli*, *Salmonella* spp., *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. cereus*. The cinammon extract showed a wide spectra of action on restraining the growth of all the tested bacterial strains. The rest of the extracts showed inhibited action against some of the bacterial strains. In this study the difference in the sensitivity with the extracts, was also observed between the Gram negative strains and the Gram positive strains.

KEY WORDS

Bacteria, Inhibition, Extracts, Essential oils.

RESUMEN

Se evaluó el efecto bactericida de extractos acuosos de canela, clavo, laurel y tomillo, sobre cepas de *E. coli*, *Salmonella* spp., *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. cereus*. El extracto de canela mostró un amplio espectro de acción, al detener el crecimiento de todas las bacterias ensayadas. Los demás extractos, demostraron acción inhibitoria contra algunas de las cepas bacterianas. En este estudio, también se observó, la diferencia en la sensibilidad frente a los extractos, entre las cepas Gram negativas y las Gram positivas.

PALABRAS CLAVE

bacteria, inhibición, extractos, aceites esenciales.

INTRODUCCION

En la actualidad se conoce sólo de manera parcial, la composición química de las sustancias antimicrobianas de las especias. Se sabe que dentro de sus componentes se encuentran alcaloides como en la pimienta, taninos, aldehídos y ácidos orgánicos como en el clavo y la canela. Se ha descubierto que las sustancias antimicrobianas de la mayoría de las especias son los propios aceites esenciales, mezclas de diferentes productos volátiles, entre los que se incluyen alcoholes, cetonas- éteres fenólicos, fenoles, ácidos y sus ésteres (Pearson y Marth, 1999). Muchos de los hidrocarburos, alcoholes y cetonas son terpenoides. Los bulbos y granos de mostaza, poseen derivados sulfurados. Es interesante encontrar que existen algunas patentes, empleando combinaciones de éstas sustancias para conservar alimentos, como la patente DRP 69870 que hace una mezcla de ácido acético y esencia de tomillo (Muller, 1989).

Es bien conocida la transmisión al hombre de bacterias patógenas a través del consumo de los alimentos con bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*, siendo, por esto, reconocidos como microorganismos de vital importancia para la salud pública. Este grupo de bacterias, debido a su ubicuidad e incidencia, se ha constituido en el blanco de acción de muchos de los sistemas de aseguramiento de la calidad en industrias alimenticias.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, tomillo, clavo y canela sobre cinco bacterias patógenas importantes y frecuentemente vehiculizadas por los alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

BACTERIAS

Se trabajó con las siguientes cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales fueron adquiridas en la Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. Estas cepas se mantuvieron

en Agar Nutritivo, realizando repiques periódicos en el mismo medio de cultivo, incubando a 37°C y conservándolas, luego de 24 horas de incubación, a 4°C.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Para efectos del presente estudio, se trabajaron con las siguientes plantas: laurel (*Myrica parvifolia*), tomillo (*Thymus vulgaricus vulgare*), clavo (*Eugenia caryophylla*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*) las cuales fueron adquiridas en un mercado local. El procedimiento de extracción fue el siguiente: lavado con agua destilada, seguido de una desinfección utilizando hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm durante 5 minutos. Posteriormente se realizó un enjuague de la planta con suficiente agua destilada estéril, esto, para retirar los residuos de hipoclorito; seguidamente se procedió a realizar un triturado de cada planta, utilizando para ello una licuadora, con recipientes de vidrio estériles, en presencia de una mínima cantidad de agua destilada estéril. Luego, el triturado fue filtrado en dos etapas, una utilizando una gasa plegada varias veces, y la siguiente, empleando papel de filtro Whatman realizando la filtración tres veces. Finalmente, los extractos fueron esterilizados por medio de filtración por membrana (poro 0,45 μ). El extracto final se transfirió a viales estériles, que se conservó a 4°C, hasta su utilización.

PATRONES DE McFARLAND

Utilizando como guía el patrón de McFarland N° 5, se preparó un patrón para cada cepa bacteriana. Para la obtención de la suspensión para cada cepa, se tomaron asadas del crecimiento del microorganismo, a partir de un cultivo en Agar Nutritivo con 24 horas de incubación, repicado de la cepa original conservada en refrigeración. Las asadas se disolvieron en tubos con agua destilada estéril, hasta provocar una turbidez equivalente a la del patrón de McFarland guía, medida en términos de Absorbancia, procurando un margen de error de 0,005 con respecto al patrón guía. La equivalencia en concentración de microorganismos por unidad de volumen fue determinada mediante recuento en placa,

realizando sucesivas diluciones decimales consecutivas, sembrando posteriormente, en profundidad, en Agar SPC (Standard Plate Count) de Merck, incubado a 37°C durante 24 horas y realizando finalmente el recuento respectivo.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO

Para observar el efecto inhibitorio de los extractos sobre el crecimiento de las bacterias, se realizaron diluciones decimales consecutivas a partir de los patrones anteriormente preparados. Se ensayaron siembras de las diluciones 10^3 y 10^5 , sembrando de cada dilución 0,1 ml en superficie, por duplicado, en Agar Nutritivo homogeneizando con un asa de hockey. Una vez inoculado el respectivo microorganismo, se procedió a impregnar discos de papel filtro (Whatman) de 4 mm de diámetro, con cada extracto, distribuyéndolos en las cajas de petri de manera equidistante. Se empleó como control negativo un disco de papel filtro impregnado con agua destilada estéril, el cual se ubicó en la segunda caja. Todas las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al término del tiempo de incubación, se observaron las cajas, seleccionando aquellos discos que presentaron un halo de inhibición del crecimiento. Estos halos fueron medidos utilizando una regla milimetrada, expresando los resultados de la medición, como el radio de toda la zona de inhibición alrededor del disco (substrayendo el radio del disco de papel). El promedio aritmético de cada una de las réplicas para cada cepa y extracto fué registrado en los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede apreciar, en las figuras 1 a 4, el efecto antibacteriano de los extractos ensayados es muy variable, dependiendo éste de la cepa ensayada y del extracto como tal, presentándose para el mismo extracto y la misma cepa, diluciones en las que existe inhibición y diluciones en las que ésta inhibición es prácticamente nula.

El extracto de laurel presentó mayor poder inhibitorio contra *S. aureus* (Figura 1), siendo éste el único microorganismo frente al cual su acción

es consistente en las dos diluciones ensayadas (10^3 y 10^5); adicionalmente, presentó inhibición frente a las demás cepas, pero con un comportamiento irregular, mostrando halos de 5 mm contra *E. coli*, a excepción de *Ps. aeruginosa* contra la que no se observó ningún efecto inhibitorio. Esto último concuerda con los resultados hallados por López y col. (2005), quienes analizando el poder inhibitorio de aceites esenciales de varias plantas, encontraron que *Ps. aeruginosa*, no fue inhibida por ninguno de los extractos ensayados.

El extracto de clavo demostró ser principalmente efectivo contra *S. aureus*, caso contrario ocurrió frente a *Salmonella* spp., ante la cual no se observó inhibición alguna. Frente a las demás cepas, este extracto, presentó inhibición cuando se empleó la dilución más concentrada del microorganismo (Figura 2). Por otro lado, el extracto de canela presentó un efecto inhibitorio en las dos diluciones ensayadas (10^3 y 10^5) frente a *Salmonella* spp., *S. aureus* y *Ps. aeruginosa* (Figura 3). Contra las demás cepas también demostró inhibición del crecimiento, sólo en una de las dos diluciones ensayadas; el poder inhibitorio de este extracto fue considerable, presentando un promedio de halo de inhibición de 10 mm contra *S. aureus* y de 6 mm contra *B. cereus*, siendo éstos promedios superiores a los presentados contra *Salmonella* spp., *E. coli* y *Ps. aeruginosa*. Esto último hace suponer que su poder inhibitorio es más fuerte frente las bacterias Gram positivas que frente las Gram negativas. Estos resultados coinciden con los hallados por Burt (2004) y Smith-Palmer y col. (1998); éstos últimos, trabajando con extractos de canela, clavo y tomillo, entre otros, encontraron que bacterias como *S. aureus*, y *L. monocytogenes* eran más sensibles frente a estos extractos.

Los aceites esenciales del clavo y la canela, están siendo estudiados como sustancias antimicrobianas para la conservación de muchos alimentos; el extracto de canela, por ejemplo, fue ensayado en jugo de manzana pasteurizado, en combinación con otras sustancias, con el fin de inactivar el crecimiento

de *S. Typhimirium* y *E. coli* O157:H7; Yuste y Fung (2004), encontraron que la combinación de nisina y extracto de canela aceleran la destrucción de estas bacterias, aumentando así la seguridad de este producto.

El extracto de tomillo presentó un notorio efecto inhibitorio frente a *Salmonella* spp., en la dilución 10^5 , evidenciando halos de inhibición de 15 mm (Figura 4). Estos resultados son coherentes con los hallados por Friedman y col. (2002), quienes analizando extractos de clavo, orégano, canela, mejorana, tomillo, entre otros, sobre *Salmonella enterica*, encontraron que el de tomillo fue uno de los más efectivos. Adicionalmente, este extracto evidenció inhibición frente a *B. cereus*, *E. coli* y *Ps. aeruginosa*, aunque sólo en una de las diluciones probadas.

CONCLUSIONES

Se ha encontrado que los componentes activos de los extractos de clavo y canela son similares entre sí, haciendo suponer que su acción antibacteriana también lo es; sin embargo, en los resultados encontrados en este estudio no se evidencia esta similitud. Los componentes comunes a las dos esencias son el ácido benzoico y el eugenol, siendo el o-metoxicinamaldehído y el aceite de canela, componentes típicos de la canela que no los posee el clavo (Hitokoto y col., 1980). Tal vez en éstos dos últimos componentes radique la diferencia de acción de las dos especias frente a *Ps. aeruginosa* y *Salmonella* spp., y posiblemente estos dos microorganismos sean más sensibles a estos compuestos, ya que la acción antibacteriana del clavo con éstas dos cepas fue muy débil. Parece ser que el o-metoxicinamaldehído, es de los componentes más activos de la canela, esto lo comprobaron Chang y col. (2001) quienes observaron que esta sustancia era la que tenía el mayor poder antimicrobiano, comparada con otros componentes de la canela, al encontrar que las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), frente a bacterias como *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella* spp, entre otras, era muy bajo, del orden de 500 a 1000 microg/ml; adicionalmente se ha demostrado su acción

antimicrobiana y su fuerte inhibición ante mohos dermatofitos (Hitokoto y col., 1980) y frente a bacterias aisladas a partir de niños gravemente infectados (Hersch-Martinez y col. 2005). En este estudio se observó que el extracto de canela ejercía un importante efecto inhibitorio frente a *B. cereus*, coincidiendo con los resultados hallados por Valero y Salmeron (2003), quienes demostraron que la adición de 5 μ l de extracto de canela/100 ml de caldo, en combinación con temperaturas de refrigeración, eran suficientes para inhibir el crecimiento de esta bacteria en un alimento mínimamente procesado, lo que es especialmente importante, si se tiene en cuenta que cepas enterotoxigénicas de *B. cereus* psicrotrofas, pueden crecer a baja temperatura en ausencia del extracto. Todo esto, aporta mayor evidencia para la utilización de este tipo de extractos como una alternativa a los conservantes alimentarios tradicionales.

Así también, se conoce que el eugenol, uno de los componentes mayoritarios del clavo, posee una buena actividad antibacteriana. Hao y col. (1998), encontraron que el eugenol fue muy efectivo contra *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophila* en carne cocida refrigerada. Sin embargo, a pesar de que el clavo mostró inhibición contra cuatro de las cinco cepas, su poder inhibitorio no fue muy evidente, siendo menor que el demostrado por la canela, lo cual es sustentado por lo hallado por Deans (1987), quien encontró que la canela tiene un espectro de acción similar al del clavo, pero su poder inhibitorio es mayor.

El extracto de tomillo demostró un escaso poder inhibitorio frente a las cepas ensayadas. Esto puede ser debido a que al parecer, el efecto de este extracto es mucho mejor cuando las condiciones son anaeróbicas. Esto se podría explicar teniendo en cuenta que en un ambiente anaeróbico existe una menor producción de energía, comparado con las condiciones de aerobiosis, aumentando éstas últimas condiciones la resistencia del microorganismo frente a la acción de los extractos (Juven y col., 1994). Se sabe que el mecanismo de acción de su aceite esencial, timol, es el de, luego de

atravesar la pared celular de la bacteria, interactuar con las proteínas de membrana ocasionando una alteración en el flujo de protones a través de la membrana, afectando de ésta manera las actividades celulares mediadas por la fuerza protomotriz.

En el presente estudio, el extracto de laurel se comportó de manera similar a los resultados reportados por Deans y Ritchie (1987), quienes encontraron que el laurel ejerce una amplia inhibición sobre *S. aureus*, una mediana acción frente a *E. coli* y *Salmonella* spp. y una falta total de inhibición contra *Ps. aeruginosa*.

De las cinco cepas ensayadas, *Salmonella* spp., parece ser la más resistente frente a la acción de los diversos extractos, siendo marcadamente sensible sólo ante la canela y el tomillo, los demás extractos no demostraron un claro efecto inhibitorio sobre ésta bacteria,. En general, si observamos el comportamiento de las tres cepas Gram negativas, es notoria la tendencia a presentar mayor resistencia comparadas con las Gram positivas. Por ejemplo *S. aureus*, demostró ser la cepa más sensible a la acción de los diferentes extractos mostrando susceptibilidad, en mayor o menor grado, ante todos extractos ensayados, el extracto que mostró ser inocuo para la mencionada cepa, fue el de tomillo. *B. cereus*, aunque no resultó ser tan sensible como *S. aureus*, exhibió una susceptibilidad mayor que las Gram negativas, destacándose que tres de los extractos son inhibidores en todas las diluciones ensayadas. Estas observaciones se corroboran con los

resultados obtenidos por Hefnawy y col. (1993), quienes hallaron que *S. aureus* y *B. cereus* fueron las cepas más sensibles a la acción del romero y el ajo. Lachowicz y col. (1997), encontraron igualmente, que las cepas Gram positivas, fueron más sensibles frente a la albahaca. El hecho de que las bacterias Gram negativas sean más resistentes frente a los aceites esenciales que las Gram positivas, se explica por la composición de su membrana externa, la cual posee cadenas de polisacáridos hidrofílicos que actúan como barrera frente a los aceites esenciales hidrofóbicos (Inouye y col. 2001).

Sería de gran interés, determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de canela y clavo que fueron los que arrojaron resultados más alentadores; adicionalmente, se espera en ensayos posteriores, incluir bacterias emergentes como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter jejuni*, para así conocer el efecto de los extractos aquí mencionados sobre estas importantes bacterias de reconocida patogenicidad para el hombre.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración prestada por el personal adscrito al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Pamplona, a los estudiantes que colaboraron en el estudio. También damos gracias al soporte prestado por el Center for Food Safety and Quality Enhancement de la Universidad de Georgia.

FIGURA 1: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO DE LAUREL

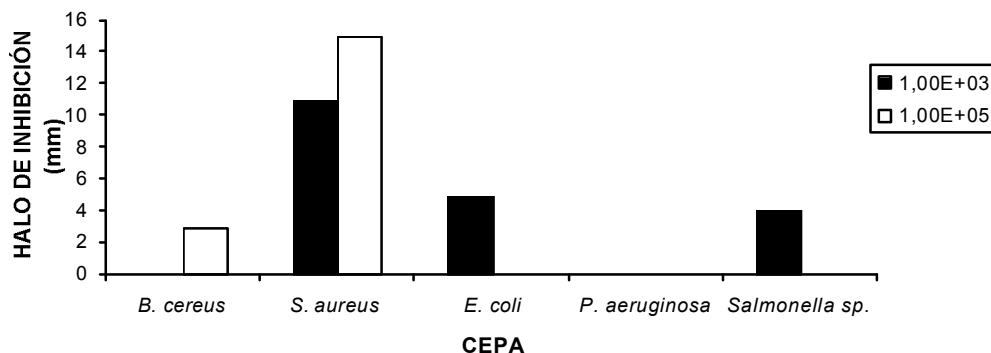


FIGURA 2: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO DE CLAVO

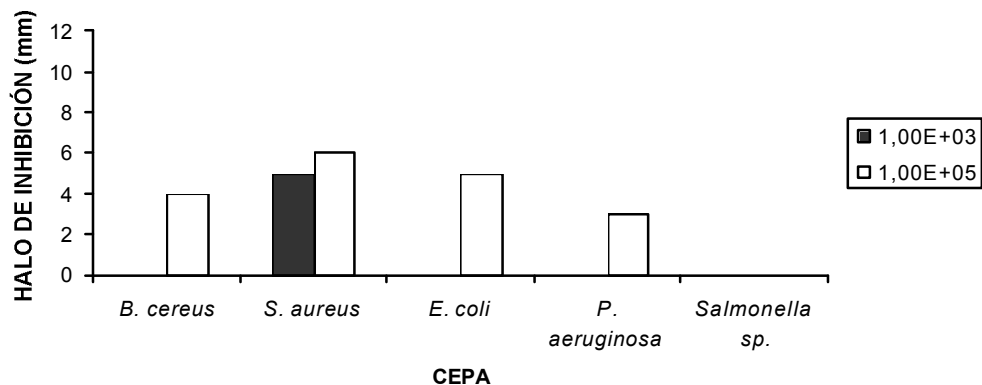


FIGURA 3: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO DE CANELA

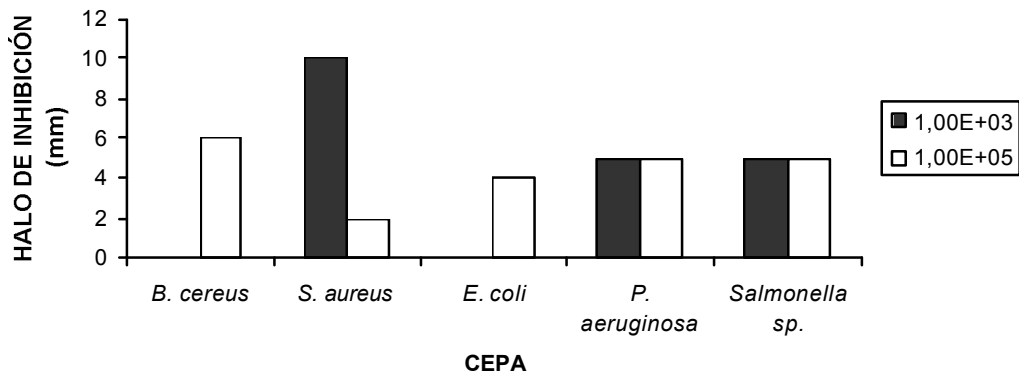
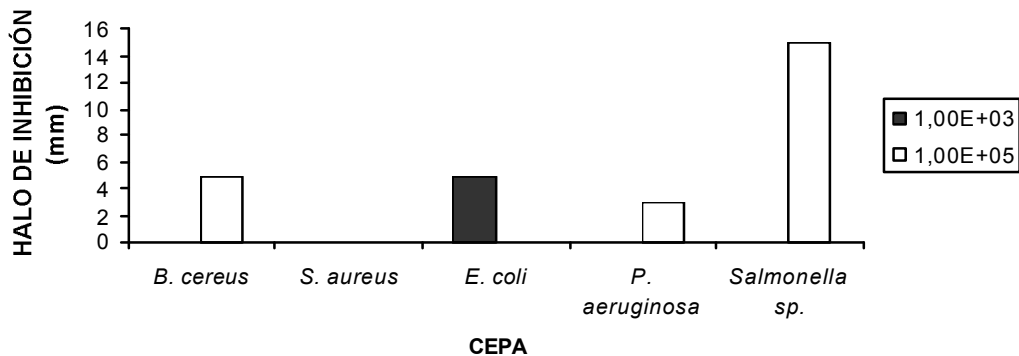


FIGURA 4: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO DE TOMILLO



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *Int.J.Food Microbiol.*94(3):223-53.

Chang, S.T., P.F. Chen y S.C. Chang. 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Ethnopharmacol.* 77(1): 123-7.

Deans S.G. y G. Ritchie.1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *Int. J. Food. Microbiol.*5:165 -180.

Friedman, M., P.R. Henika, R.F. Mandrell. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* 65(10): 1545-60.

Hao, Y., R. Brackett y M. Duyie.1998. Inhibition of *Listena Monocytogene* and *Aeromonas hydrophyla* by plants extracts in refrigerated cooked beef. *J. Food Prot.* 61 : 307-312.

Hefnawy, Y.A., S. Moustafa y H. Marth-Elmer H.1993. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to selected spices. *J. Food Prot.* 56: 876 - 878.

Hersch-Martínez, P., B.F. Leanos-Miranda y F. Solorzano-Santos. 2005. Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. *Fitoterapia.*76(5):453-7.

Hitokoto, H., S. Morozumi, S. Wauke y H. Kurata. 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 : 818 - 822.

Inouye, S., T. Takizama y H. Yamaguchi. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antim. Chem.*47: 565-573.

Juven, B.J., J. Kanner, F. Schved y H. Wełowicz.1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76 : 626 - 631.

Lachowicz, K.J., G.P. Jones, D.R. Briggs, F.E. Bienvenu, J. Wan, A. Wilcock A. y M. J. Coventry.1997. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 209-214.

Lopez P., C. Sanchez, R. Battle y C. Nerin. 2005. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J.Agric.Food.Chem.*53(17):6939-46

Muller, G. 1989. Especies y condimentos. En: *Microbiología de los alimentos vegetales*. 3ª edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España, p. 150- 153.

Pearson, L. y E. Marth 1990. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by cocoa in a broth medium and neutralization of this effect by caein. *J. Food Prot.* 53 : 38- 46.

Smith-Palmer, A., J. Stewart y L. Fyfe. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl.Microbiol.*26(2):118-22.

Valero, M. y M.C. Salmeron. 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *Int.J.Food.Microbiol.* 85(1-2):73-81.

Yuste J. y D.Y. Fung. 2004. Inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice by a combination of nisin and cinnamon. *J. Food. Prot.* 67(2): 371-7.