

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES DE *OCOTEA QUIXOS* (LAM.) KOSTERM, *BURSERA GRAVEOLENS* (KUNTH) TRIANA Y PLANCH, *CYMBOPOGON CITRATUS* (DC) STAPF. Y *CURCUMA LONGA* (L.) SOBRE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES DE ALIMENTOS

*Flor Marina Fon-Fay*¹, *Alicia Casariego*², *Ana Silvia Falco*³ y *Jorge A. Pino*³

¹*Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Campus Manuel Haz Álvarez. Ave. Quito km 1,5 vía Santo Domingo de los Tsáchilas, EC.120301, Quevedo, Ecuador.*

²*Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.*

³*Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. La Habana, Cuba.*

E-mail: facultadci@uteq.edu.ec

RESUMEN

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de cuatro especies ecuatorianas *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm; *Bursera graveolens*, (Kunth) Triana y Planch, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. y *Curcuma longa* (L.) fue evaluada mediante el método de difusión en discos. Se determinó también la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales frente a *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. enteritidis*, *A. niger* y *P. citrinum*. Los aceites esenciales de *O. quixos* y *B. graveolens* fueron los aceites que mostraron fuerte actividad antimicrobiana, en cambio el aceite esencial de *C. citratus* presentó efecto antibacteriano pero mostró un débil efecto antifúngico. El aceite esencial de *C. longa* solo mostró débil acción antimicrobiana.

Palabras clave: Aceites esenciales, actividad antimicrobiana, *Ocotea quixos*, *Bursera graveolens*, *Cymbopogon citratus*, *Curcuma longa*.

ABSTRACT

Antimicrobial activity of essential oils from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm, *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. and *Curcuma longa* L. against food contaminant microorganisms

The antimicrobial activity of the essential oils of four Ecuadorian species *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm; *Bursera graveolens* (Kunth) Triana and Planch, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. and *Curcuma longa* (L.) was evaluated by the disc diffusion method. The minimum inhibitory concentration of essential oils against *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. enteritidis*, *A. niger* and *P. citrinum* was also determined. The essential oils of *O. quixos* and *B. graveolens* showed strong antimicrobial activities, whereas the essential oil of *C. citratus* presented antibacterial effect but showed a weak antifungal effect. The essential oil of *C. longa* only showed weak antimicrobial action.

Keywords: Essential oils, antimicrobial activity, *Ocotea quixos*, *Bursera graveolens*, *Cymbopogon citratus*, *Curcuma longa*.

INTRODUCCIÓN

La práctica de consumir alimentos frescos o lo más semejante a su forma original ha ido incrementándose en los últimos años, debido a que la incorporación de algunos aditivos químicos tiene restricciones sanitarias por su toxicidad (1). Esto ha generado la necesidad de buscar alternativas de conservación que permitan

^{*}*Flor Marina Fon Fay Vásquez: Ingeniera Química (Universidad de Guayaquil, 1987). Master en Investigación para el Desarrollo Educativo (Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 2015). Su principal línea de investigación es sobre actividad antimicrobiana de aceites esenciales.*

armonizar la acción antimicrobiana con la compatibilidad en el alimento. Desde este punto de vista, los extractos de plantas se han convertido en una opción potencial para la industria alimentaria, ya que un gran número de ellas producen compuestos bioactivos que podrían emplearse tanto para preservar los alimentos como la salud (2-4). La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (AE) se ha estudiado en diferentes campos como el farmacéutico, el agronómico y en la conservación de alimentos se emplean en la formulación de coberturas y películas biodegradables como alternativa frente a agentes antimicrobianos sintéticos (5).

La mayor parte de estos estudios han sido desarrollados en Asia, EE.UU. y Europa, aunque actualmente en América del Sur se ha incrementado el interés en las investigaciones sobre el tema debido a la riqueza etnobotánica de la Amazonia y al conocimiento ancestral de las propiedades de muchas de las especies que la habitan (6). El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm (isphpingo); *Bursera graveolens* (Kunth) Triana y Planch (palo santo), *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. (hierba luisa) y *Curcuma longa* L. (cúrcuma), frente a algunos microorganismos contaminantes de alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los aceites esenciales de rizomas de *C. longa*, así como hojas de *O. quixos* y *C. citratus*, obtenidos por destilación por arrastre con vapor, se adquirieron a la empresa Fundación Chankuap (Macas, provincia Morona Santiago, Ecuador), durante mayo 2017; mientras que el aceite esencial de *B. graveolens* fue adquirido a la empresa Young-Living (Guayaquil, Ecuador).

Se evaluaron cinco especies de microorganismos de referencia internacional que pueden encontrarse en alimentos. Dentro de la selección se incluyeron bacterias Gram-positivas (G+) y Gram-negativas (G-) y dos especies fúngicas, todos procedentes de la colección del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana: *E. coli* ATCC 25922 (G-), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (G+), *Salmonella Enteritidis* ATCC 13036(G-), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (G+), *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Penicillium citrinum* ATCC 9849.

Los inóculos de bacterias se prepararon a partir de cultivos frescos (18 a 20 h) que fueron suspendidos en solución estéril de cloruro de sodio (0,85 %), se homogeneizó y se ajustó la concentración a 10^6 ufc/mL mediante escala de McFarland. Las esporas de las especies fúngicas se arrastraron con 1 mL de agua estéril y se ajustó la concentración a 10^6 ufc/mL, mediante cámara de Newbauer.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales frente a los microorganismos seleccionados se determinó mediante dos métodos:

Prueba de difusión en agar, con discos de papel de acuerdo con la metodología propuesta por Kirby Bauer y recomendada por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de EE.UU. (7-9). Se procedió diseminando los inóculos microbianos (500 μ L) con espátula de Drigalsky sobre la superficie de placas con Agar Mueller Hinton y se dejaron secar entre 3 y 5 min. Con pinza estéril de punta fina se colocaron los discos de papel de filtro Whatman No. 4 ($\phi = 6$ mm) con 5 y 10 μ L de los AE. Se emplearon como controles positivos 10 μ L de Ampicilina 1 % m/v (antibiótico) y 10 μ L de Fluconazol al 5 % m/v (antifúngico). Las placas Petri se dejaron en reposo durante media hora para permitir la difusión radial del antimicrobiano. Se incubaron a las temperaturas de crecimiento de cada microorganismo (bacterias 30 ± 2 °C y hongos 25 ± 1 °C). La lectura de los resultados (halos de inhibición en mm) se llevó a cabo a las 24 h (bacterias) y al quinto día (hongos), aunque se realizaron observaciones diarias de estos últimos. La ausencia de crecimiento alrededor del disco ($\phi > 10$ mm) se consideró como indicador de que el aceite esencial muestra actividad antimicrobiana (9).

El otro método fue la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), se llevó a cabo mediante el método de dilución en tubos. Se efectuó con aquellos aceites que presentaron actividad antimicrobiana, las concentraciones se calcularon según los resultados obtenidos del método de difusión. Las concentraciones estudiadas fueron: 5; 0,5; 0,05 y 0,005 μ L/mL, respectivamente a partir de diluciones de cada AE en dimetil sulfoxido. En tubos de ensayo se pusieron en contacto 1 mL de las diluciones de los AE con 1 mL del inóculo microbiano (10^6 ufc/mL suspendidos en caldo Mueller Hinton). Los tubos se incubaron a 32 ± 2 °C (bacterias) y a 25 ± 1 °C (hongos)

durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se sembró 1 mL del contenido de los tubos, empleando medios apropiados para el crecimiento de cada microorganismo y se incubaron a las temperaturas referidas anteriormente. La CMI se determinó como la menor concentración del aceite esencial capaz de inhibir el crecimiento microbiano (8). Los ensayos se replicaron tres veces.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *O. quixos*, *B. graveolens*, *C. citratus* y *C. longa* según el método de difusión en agar mostró que todos los AE presentan actividad antimicrobiana, aunque con diferente intensidad. La concentración de 10 µL/disco de los AE, mostró una fuerte inhibición de todos los microorganismos, lo que impidió hacer una medición confiable de los halos; por esta razón, los resultados que se informan en la Tabla 1 son los correspondientes a la concentración de 5 µL/disco y según estos resultados, de todos los AE, *St. aureus* y *B. subtilis* fueron los que mostraron mayores zonas de inhibición, semejantes a las aparecidas con ampicilina al 1 %, esto concuerda con lo referido por otros autores que las bacterias G+ son más sensibles que las G- y se debe fundamentalmente a la composición de su membrana celular (10).

Las diferencias en la acción antimicrobiana de los aceites esenciales, se deben a que son mezclas complejas donde existen diversos grupos químicos, por lo que la

efectividad no se atribuye a un mecanismo específico. Los eventos inhibitorios pueden llevarse a cabo en forma independiente, simultánea o consecutiva, proponiéndose como principal sitio de acción la membrana celular.

Por otra parte, el carácter hidrófobo de los AE les permite incorporarse a los lípidos que constituyen las membranas, alterando su estructura con el consecuente aumento en la permeabilidad (6, 11).

La Tabla 1 muestra que el aceite de *C. longa* es el que menor actividad antimicrobiana manifestó, pues no inhibió a *E. coli*, *B. subtilis* y *A. niger*, solamente fueron sensibles *St. aureus*, *S. enteritidis* y *P. citrinum* que mostraron pequeñas zonas de inhibición, este resultado coincide con otros autores, que refieren que el aceite de *C. longa* tuvo una actividad antimicrobiana menor que la observada con el extracto hidroalcohólico y solo la concentración de 1 g/L del aceite mostró un porcentaje de reducción del crecimiento superior al 50 % para *Bacillus sp.*, otras bacterias como *E. coli*, *Salmonella sp.* y hongos obtuvieron porcentajes inferiores (12).

La Tabla 2 presenta las CMI de los AE obtenidas, que se encontraron en el intervalo de 5 y 0,005 µL/mL. De acuerdo con lo obtenido en ambas pruebas se puede plantear el siguiente orden de efectividad para los AE: *O. quixos* > *B. graveolens* > *C. citratus* > *C. longa*.

Tabla 1. Diámetro de las zonas de inhibición (mm) de cada microorganismo con los aceites esenciales

Muestra (5 µL/disco)	Microorganismo					
	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. citrinum</i>
<i>Ocotea quixos</i>	16	20	16	20	15	19
<i>Bursera graveolens</i>	12	18	19	23	19	17
<i>Cymbopogon citratus</i>	16	21	15	19	16	16
<i>Cúrcuma longa</i>	-	12	10	-	-	10
Ampicilina (1%)	17	20	19	21	-	-
Fluconazol (5%)	-	-	-	-	20	22

(-) No hubo inhibición

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales para cada microorganismo

Aceite esencial ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Microorganismo					
	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. citrinum</i>
<i>O. quixos</i>	5,0	0,5	0,05	0,05	0,5	0,5
<i>B. graveolens</i>	0,05	0,005	0,05	0,05	5,0	5,0
<i>C. citratus</i>	0,5	0,005	0,05	5,0	5,0	5,0
<i>C. longa</i>	-	0,05	-	0,5	-	5,0

(-) No hubo inhibición

El AE de *O. quixos*, fue el que presentó mayor acción antimicrobiana y *E. coli* fue el microorganismo que mostró mayor resistencia presentando una CMI de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, los demás, incluyendo las especies fúngicas exhibieron valores muy inferiores. Otros autores han referido niveles análogos para este aceite esencial, siendo 6,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ la CMI de *E. coli* y 0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ la encontrada para *St. aureus* (6).

El AE de *O. quixos* presenta un elevado contenido de cinamaldehído, el cual ha mostrado en otros estudios una fuerte acción antimicrobiana. Se conoce que actúa inhibiendo la síntesis enzimática de proteasas y amilasas en los microorganismos provocando debilitamiento y lisis de la pared celular. Otros estudios indican que tiene una marcada efectividad sobre bacterias G+ como *St. aureus* y *Enterococcus fecalis* y sobre G- como *Pseudomonas sp.* y *Salmonella sp.* y también contra algunas especies fúngicas patógenas (13).

B. graveolens por su parte fue el otro AE que mostró una fuerte actividad, sobre todo para las bacterias, obteniéndose valores de CMI en el rango de 0,005 y 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. En contraste, el efecto antifúngico encontrado fue menor; los hongos *A. niger* y *P. citrinum* mostraron mayor resistencia a este AE, con igual valor de CMI (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Este efecto se atribuye a la alta concentración de compuestos monoterpénicos oxigenados presentes (6, 13, 14).

De todos los microorganismos estudiados el más sensible para este AE fue *St. aureus*, que exhibió la CMI más baja (0,005 $\mu\text{L}/\text{mL}$). En otros estudios

con este AE se informaron valores similares para *E. coli* (0,07 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y para *St. aureus*, (0,009 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (14). Otros autores lograron 100 % de letalidad para *E. coli*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *St. aureus* y hongos de los géneros *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* y *Rhizopus sp.* con 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de AE de *B. graveolens*, aunque en el estudio no lo refieren como CMI (12).

De acuerdo con los resultados sobre la actividad antimicrobiana de estos dos AE, se puede afirmar que ambos son muy efectivos para eliminar un amplio grupo de microorganismos donde se pueden incluir tanto bacterias G+ como G- y varios hongos (10-13).

Con respecto al AE de *C. citratus* se apreció un comportamiento diferente a los dos AE anteriores y la actividad mostrada pudiera considerarse intermedia. *B. subtilis*, *A. niger* y *P. citrinum* fueron los microorganismos que mostraron mayor resistencia, que se evidencia en la CMI de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, superior a la exhibida por *E. coli*, *St. aureus* y *S. enteritidis* que estuvo en el rango entre 0,005 y 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. En la acción antimicrobiana del AE de *C. citratus* existen discrepancias entre los resultados obtenidos por diferentes autores, unos concluyen que las bacterias G+ fueron las más sensibles (13); sin embargo, otros aseguran lo contrario, esto se ha atribuido a que las diferencias genéticas entre algunas cepas de *Cymbopogon* ejercen gran influencia en la actividad antibacteriana de su AE (13-16). El efecto antimicrobiano se atribuye a los aldehídos monoterpénicos geranial y neral (14).

Si se compara la acción de los cuatro AE estudiados, el AE de *C. longa* fue el que presentó menor efecto antimicrobiano, siendo solamente activo frente a las bacterias G+ (*St. aureus* y *B. subtilis*), este resultado coincide con lo referido en otras investigaciones en donde la mayor actividad del AE se observó también frente a *St. aureus* y *B. subtilis*. Este resultado se atribuye al alto contenido de monoterpenos y *ar*-turmerona (15).

En resumen, la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales está en dependencia de diversos factores entre los cuales la composición química y la concentración empleada son importantes, aunque también se puede ver influenciada por el tipo de microorganismo, el medio y el método de obtención del aceite (5, 12, 16).

REFERENCIAS

1. Ávila Sosa, R. y López-Malo, A. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 2(2):4-13, 2008.
2. Pino, N. Revista Institucional de la Universidad Tecnológica del Chocó 27:67-75, 2009.
3. Torres, J. *Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de Luma chequen. «arrayan»* (tesis de grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú) 2014.
4. Reyes-Jurado, F.; Palou, E. y López-Malo, A. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 8(1):68-78, 2014.
5. Cabrera-Martínez, P. F. y Yaguache-Camacho, B. D. *Aceites esenciales de plantas amazónicas para el control de fitopatógenos de cultivos convencionales* (tesis de maestría, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Pichincha, Ecuador) 2015.
6. Ramírez, L. S, Castaño, M. D. Scientia et Technica XV(42), 2009.
7. Lahlou, M. Phytoterres 18(6):435-448, 2004.
8. Duraffourd, C.; D'hervocourt, L. y Lapraz, J. C. Fitoterapia Clínica. Barcelona, Masson, S.A., 1986.
9. Murbach, B. F.; Andrade, T.; Nunes-Barbosa, L.; Da Silva, I.; Fernandes, A. J. J. Essential Oil Res. 26(1):34-40, 2014.
10. Da Silva, I.; Fernandes, A. J. J. Essential Oil Res. 39(3):402-413, 2010.
11. Méndez, N.; Angulo, A. y Contreras, O. Int. J. Trop. Biol. 64(3):1201-1208, 2016.
12. Prieto, J.; Pavón, L.; Patiño, O.; Delgado, W. Revista colombiana de química 39(2):199-209, 2010.
13. Herrera-Carrión, M. P. *Estudio de composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de Ocotea quixos (Lam.) Kostern* (tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador, Cuenca, Ecuador) 2017.
14. Torres, R. E.; Moreno, S. R.; Tamayo, V. Y; Hermosilla, E. R. y Guillén, G. Z. Química Viva 13(2):123-129, 2014.
15. Sánchez, C.; Cruz, M. y Alvarado, Y. Biotecnología Vegetal 17(3):187-201, 2007.
16. Bravo-Arias, O. F. Diseño de un desinfectante para pisos a base de aceite esencial de *B. graveolens* (tesis de grado, Universidad católica de Loja, Loja, Ecuador) 2015.

De acuerdo con los resultados de esta investigación, *O. quixos* y *B. graveolens* fueron los aceites esenciales que mostraron mejor efectividad antimicrobiana *in vitro* y pueden ser considerados como alternativas para posibles aplicaciones en la conservación de alimentos.

CONCLUSIONES

Los aceites esenciales de *Ocotea quixos* y *Bursera graveolens* fueron los aceites que mostraron mayor actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *B. subtilis*, *St. aureus*, *S. enteritidis* y hongos como *A. niger* y *P. citrinum*, en cambio el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* presentó efecto antibacteriano pero débil efecto antifúngico. El aceite esencial de *Curcuma longa* solo mostró débil acción antimicrobiana.