

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE ALGUNAS ESPECIAS
NATURALES SOBRE MICROORGANISMOS
ASOCIADOS A ALIMENTOS

Proyecto de investigación para optar por el grado de Licenciatura
en Microbiología y Química Clínica

María Alejandra Cubillo Arrieta

Tutora: Dra. María Laura Arias

Julio, 2007
San José



**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA**

**FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO**

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el miércoles 04 de julio del año 2007 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **ALEJANDRA CUBILLO ARRIETA** carné A11124, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de **PRACTICA DE GRADUACIÓN**, para optar por el grado académico de **LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA** y el título profesional de **DOCTORA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA**.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dr. Carlos Chacón **PRESIDENTE**
Dra. María Laura Arias
Dra. Carolina Chaves
Dr. Javier Mora
Dr. Mario Rivel

ARTICULO 1

El presidente informa que el expediente de **ALEJANDRA CUBILLO ARRIETA**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que la postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

ARTICULO 2

La postulante **ALEJANDRA CUBILLO ARRIETA**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación titulo “**Determinación de la actividad antimicrobiana de algunas especies naturales sobre microorganismos asociados a alimentos**”.

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 9.5

ARTICULO 5

El presidente del Tribunal comunica a la Postulante el resultado de la deliberación y la declara acreedora al grado de **Licenciada en Microbiología y Química Clínica** y al título profesional de **Doctora en Microbiología y Química Clínica**.

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocada. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y a la Postulante, a las 10.05 a.m horas.

Dr. Carlos Chacón
Presidente

Dra. María Laura Arias

Dra. Carolina Chaves

Dr. Javier Mora

Dr. Mario Rivel

Alejandra Cubillo Arrieta
Postulante

“A mis padres por su apoyo incondicional
durante todos estos años.

A Elverth por estar conmigo en todo momento,
brindándome su cariño, paciencia y comprensión.

Gracias por ayudarme a alcanzar esta gran meta.”

Los quiere

Alejandra

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Laura Arias por ser mi tutora y permitirme realizar este proyecto.

A la Dra. Carolina Chaves y al Dr. Mario Rivel por la ayuda que me brindaron para culminar este trabajo.

A mis compañeros y amigos por su apoyo y amistad incondicional.

A Marco y Andrés por sus consideraciones desde que inicié mis estudios.

Y por supuesto, a Dios por permitirme ser quien soy hasta el día de hoy.

TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
ACTA DE PRESENTACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	v
TABLA DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
III.1. Técnica de Difusión en Agar / Volumen.....	10
III.2. Técnica de difusión en Agar / Peso.....	11
III.3 Método estadístico.....	11
IV. RESULTADOS.....	12
V. DISCUSIÓN.....	17
VI. CONCLUSIONES.....	21
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	22

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diámetro promedio en milímetros de los halos de inhibición mostrados por los microorganismos en estudio frente a las distintas diluciones de las especies importadas	12
Cuadro 2. Diámetro promedio en milímetros de los halos de inhibición mostrados por los microorganismos en estudio frente a las distintas diluciones de las especies nativas del país ensayadas.....	13
Cuadro 3. Diámetro promedio en milímetros de los halos de inhibición mostrados por los microorganismos en estudio frente a las especies importadas en peso seco.....	14
Cuadro 4. Diámetro promedio en milímetros de los halos de inhibición mostrados por los microorganismos en estudio frente a las especies nativas del país ensayadas en peso seco.	14

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparación de la capacidad de inhibición de las distintas especies sobre <i>E.coli</i> O157:H7	15
Gráfico 2. Comparación de la capacidad de inhibición de las distintas especies sobre <i>L.monocytogenes</i>	16
Gráfico 3. Comparación de la capacidad de inhibición de las distintas especies sobre <i>A. niger</i>	16

RESUMEN

Uno de los problemas más importantes en la industria alimentaria lo constituye la contaminación de alimentos por una gran variedad de microorganismos tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.

El incremento en el número de brotes asociados a alimentos contaminados con microorganismos patógenos, consumidores más exigentes y regulaciones alimentarias cada vez más estrictas; han despertado el interés por encontrar alternativas para los preservantes químicos sintéticos, tales como los compuestos antimicrobianos naturales.

Estudios previos han analizado la actividad de especias como el clavo de olor, canela, orégano, pimienta, ajo, entre otros productos naturales, sobre diversos microorganismos asociados a alimentos, demostrando su capacidad antimicrobiana. Pese a esto, la efectividad de la especias del país ha sido poco estudiada.

En el presente proyecto se estudió el potencial inhibitorio de especias nacionales (canela, clavo de olor, orégano y pimienta) sobre *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*, por medio de la técnica de difusión en agar. Además, se comparó su efecto con respecto a especias importadas que son secadas con óxido de etileno y se estudió si existía una diferencia significativa al utilizar diluciones de las especias con respecto a la aplicación de la especia en peso seco.

Tanto la canela como el clavo de olor y el orégano, mostraron cierto grado de inhibición sobre los microorganismos estudiados; en cambio la pimienta no fue capaz de inhibir el crecimiento de ningún microorganismo. Si bien las especias importadas mostraron halos de inhibición mayores que los generados por las especias nacionales, las diferencias no fueron significativas. Tampoco se obtuvo una gran diferencia al utilizar las especias en peso seco con respecto al uso de diluciones de estas.

Palabras claves: especias nacionales, especias importadas, microorganismos, alimentos.

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación de alimentos, tanto crudos como procesados, por una variedad de microorganismos ha sido reconocida como uno de los problemas más importantes en la industria alimentaria, y en los últimos años se ha convertido en una amenaza para la salud pública (Santoyo *et al*, 2006). En los Estados Unidos, se ha estimado que patógenos asociados a alimentos causan alrededor de 7 millones de hospitalizados y más de 9 mil muertes al año; ocasionando además pérdidas económicas que rondan los seis billones de dólares (Rivera *et al*, 2004). Bacterias patógenas asociadas a alimentos tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Listeria monocytogenes* han sido reportadas como los principales agentes causales de una serie de brotes recientes en América (Samadpour *et al*, 2006).

Escherichia coli O157:H7 es un importante patógeno causante de enfermedades humanas tales como diarrea, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica trombótica (Piyawam y Limsuwam, 2006). Esta ha sido implicada en más de 73500 casos de enfermedad al año en los Estados Unidos (Gaysinsky *et al*, 2005). Aunque la mayoría de brotes asociados a alimentos causados por esta bacteria se han relacionado con carne de res cruda y leche no pasteurizada; recientemente se han visto implicados una amplia variedad de alimentos considerados tradicionalmente de bajo riesgo, entre los cuales se incluyen: salami, yogurt, mayonesa, jugos de frutas y ciertos vegetales (Rhee *et al*, 2003; Burt y Reinders, 2003).

Listeria monocytogenes es un patógeno ubicuo presente en el ambiente que se ha relacionado con equipos de procesamiento de alimentos; y es además muy difícil de controlar debido a que es relativamente termotolerante y es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas que van desde los 2.5°C hasta los 44°C; también es capaz de crecer en un amplio rango de pH, aunque generalmente el rango óptimo de crecimiento es de 6-8; e incluso es capaz de crecer a un bajo a_w (Seaberg *et al*, 2003). Ha sido asociada con enfermedades transmitidas por alimentos desde hace más de 20 años y aún continúa causando problemas, de tal forma que es responsable de una cuarta parte de todas las enfermedades transmitidas por microorganismos patógenos en los Estados Unidos (Osaili *et al*, 2006). Esta bacteria puede causar meningitis, encefalitis o septicemia; con una

elevada mortalidad en infantes, ancianos e individuos inmunosupresos (Leuschner y Ielsch, 2003). Los brotes asociados con ella se han ligado al consumo de leches no pasteurizadas, quesos, embutidos, pescado, frutas y vegetales (Greenwood *et al*, 1991).

Por otro lado, los hongos se consideran uno de los principales microorganismos causantes del deterioro de los alimentos. Tanto *Aspergillus* sp. como *Penicillium* sp. tienen importancia en el almacenamiento de los alimentos, ya que atacan productos como pescado seco, leche condensada, granos de cereales, quesos y materiales de envasado (Portillo *et al*, 2005).

Actualmente en el campo alimentario existen diversos puntos a tomar en cuenta, tales como el incremento en el número de brotes asociados a alimentos contaminados con microorganismos patógenos, la presencia de un gran número de cepas resistentes a antibióticos, y el hecho de que las regulaciones internacionales son cada vez más estrictas en cuanto a las disposiciones establecidas para que las plantas alimentarias garanticen la seguridad de los alimentos en cada uno de los pasos de su procesamiento y con ello disminuyan el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos (Rivera *et al*, 2004). También es de suma importancia tomar en cuenta el hecho de que la preservación de los alimentos es cada vez más compleja debido a que el consumidor se preocupa más por los químicos agregados a los alimentos para tal fin (Sabah *et al*, 2004; Santoyo *et al*, 2006). Debido a todo lo anterior, es que en los últimos años, se ha despertado un interés creciente por encontrar alternativas para los preservantes químicos sintéticos, tales como los compuestos antimicrobianos naturales y en particular, aquellos derivados de plantas (Guynot *et al*, 2003; Thongson *et al*, 2005), ya que estos últimos poseen entre otras características, su amplia disponibilidad, una mayor capacidad de ser biodegradados y pocos efectos secundarios o tóxicos, en comparación con los preservantes y antibióticos disponibles actualmente para tal fin (Kalemba y Kunicka, 2006).

Muchas especias, hierbas, condimentos y extractos de plantas se han utilizado comúnmente en la cocina para dar sabor, aroma y una apariencia agradable a las comidas; aunque también se ha reconocido su potencial antioxidante y se han utilizado como medicinas tradicionales en muchas partes del mundo durante generaciones, de forma tal que su papel

medicinal ha sido comprobado en muchos países desarrollados como Japón, Alemania, Estados Unidos y Canadá (Lai y Roy, 2004).

Además del valor tradicional y terapéutico de estas sustancias, muchos autores han reconocido el gran potencial antimicrobiano de las especias, demostrando su eficacia en la inhibición del crecimiento de una gran variedad de organismos, como: bacterias, hongos, virus, protozoarios e insectos (Yuste y Fung, 2004).

La actividad antimicrobiana de estos productos se ha atribuido a sus aceites esenciales, los cuales son mezclas complejas de metabolitos secundarios volátiles, lipofílicos, en su mayoría no polares, que pueden ser obtenidos por destilación o por extracción con solventes orgánicos a partir de plantas, hierbas y especias (Gaysinsky *et al*, 2005).

Los principales constituyentes de estos aceites son los sesquiterpenos, incluyendo carbohidratos, alcoholes, éteres, aldehídos, cetonas y fenoles; además de terpenos y derivados oxigenados, los cuales se encuentran generalmente presentes en bajas concentraciones (Kalemba y Kunicka, 2003).

Se ha reportado la presencia de fitofenoles como agentes antimicrobianos, principalmente, el carvacrol (5-isopropyl-2-metil-fenol) del orégano, el aldehído cinámico de la canela y el eugenol (4-alil-2-metoxifenol) del clavo de olor (Gaysinsky *et al*, 2005). Se cree que su acción antimicrobiana está asociada con la capacidad de estos compuestos de romper la membrana de los microorganismos, causando lisis y salida del ATP intracelular (Caillet *et al*, 2005).

Los terpenoides constituyen un agente soluble en lípidos que afecta la actividad de las enzimas de membrana, interfiriendo por ejemplo en la cadena respiratoria. Los terpenoides específicos con grupos funcionales tales como alcoholes o aldehídos fenólicos, interfieren con la integridad de la membrana o con enzimas asociadas, bloqueando su actividad. Algunos componentes de naturaleza fenólica como el carvacrol y el timol causan una disrupción de lipopolisacáridos, seguido por una desintegración parcial de la membrana externa (Oussalah *et al*, 2006). Otros componentes de los aceites esenciales pueden actuar

como desacoplantes, interfiriendo con la traslocación de protones e interrumpiendo subsecuentemente la fosforilación del ADP (Kalemba y Kunicka, 2003).

El modo de acción de los agentes antimicrobianos depende del tipo de microorganismo afectado y se relaciona principalmente con la estructura de su pared celular y el arreglo de la membrana externa. Las bacterias Gram-negativas poseen una resistencia intrínseca a una amplia variedad de aceites esenciales, la cual se asocia con la superficie hidrofílica de su membrana externa, rica en lipopolisacáridos, la cual crea una barrera contra agentes tóxicos; por lo que macromoléculas hidrofóbicas tales como ciertos constituyentes de los aceites esenciales son incapaces de penetrar al microorganismo (Pierre y Ryser, 2006). Algunos aceites, como por ejemplo el del té, son utilizados contra *Escherichia coli*, ya que se ha visto que ocasionan la desnaturalización de las proteínas de membrana, resultando en la disrupción de la membrana externa, inhibición de la cadena respiratoria y lisis celular. (Hugo, 1991). El mecanismo de acción de los aceites esenciales contra bacterias Gram-positivas y hongos es similar; los componentes del aceite destruyen la pared y la membrana citoplasmática de la célula bacteriana o fúngica, lo cual resulta en el escape del citoplasma y su coagulación. Además, inhiben la síntesis de ADN, ARN, proteínas o lipopolisacáridos de la célula bacteriana o fúngica (Kalemba y Kunicka, 2003).

La canela molida es quizás de las especias más utilizadas en todo el mundo. En la antigüedad era utilizada con fines medicinales, mientras que hoy en día su uso se fundamenta en su aceite esencial, el cual posee propiedades antisépticas y antimicrobianas. El principio activo de la canela es el aldehído cinámico, el cual la hace ser de las especias más bacteriostáticas junto al clavo de olor (Lai y Roy, 2004).

El clavo de olor es otra especia que ha mostrado efectos importantes sobre diversos microorganismos patógenos. Durante siglos este árbol fue considerado “el curalo todo“. En el siglo XIII, se utilizaba el clavo y su aceite esencial (el eugenol) conseguido mediante destilación; por sus propiedades germicidas, antisépticas y carminativas (Arpidae, 2005).

La pimienta es una planta perenne, nativa de la India, la cual también ha sido objeto de estudio por un posible efecto antimicrobiano. Entre sus componentes figuran la ericolina,

materias nitrogenadas y otras sustancias. Además posee propiedades como un antioxidante natural (Nakatani, 1992).

El orégano es una planta herbácea nativa de las regiones del Mediterráneo que ha sido ampliamente utilizada por siglos para darle sabor y aroma a las comidas; además se le ha atribuido un potencial antimicrobiano importante contra patógenos asociados a alimentos, microorganismos causantes de deterioro y microorganismos de origen fecal. Su poder inhibitorio se ha relacionado con el alto contenido de fenoles presentes en su aceite esencial, particularmente carvacrol y timol, aunque el mecanismo específico por el que actúan estos compuestos no se conoce con exactitud (Caillet *et al.*, 2005; Sivropoulou *et al.*, 1996).

Debido a la creciente necesidad por encontrar nuevas alternativas que permitan proteger los alimentos contra microorganismos patógenos, es posible encontrar en la literatura una serie de investigaciones resientes orientadas a descubrir y explotar el potencial efecto antimicrobiano de las hierbas y las especias naturales.

Un estudio realizado en la India en 2004 indicó que el clavo de olor, la canela, el comino y el ajo tienen una potente actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Sacharomyces cerevisiae* (Lai y Roy, 2004).

Varios investigadores han estudiado la actividad antimicrobiana de las plantas, determinando que la canela posee efecto contra patógenos tales como *Salmonella* y *E.coli*, encontrándose además que presenta un mayor efecto sobre microorganismos Gram positivos en comparación con los Gram negativos (Yuste, 2004).

Gaisinsky *et al.*(2005) estudiaron el efecto inhibitorio del carvacrol y el eugenol, encapsulados en un sistema micelar con surfactantes no iónicos, contra cuatro cepas de *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. Sus resultados demostraron que el sistema surfactante – eugenol fue más efectivo para inhibir ambos tipos de microorganismos en comparación con el sistema surfactante-carvacrol. Además vieron que para la inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes* se requiere una mayor concentración del aceite esencial que para la inhibición de *Escherichia coli* O157:H7.

Blaszyk y Holley encontraron que el eugenol inhibe completamente el crecimiento de *E. coli* O157: H7 y *Listeria monocytogenes* en un sistema microbiológico modelo a concentraciones mayores de 1, 000µg/ml; pero que para la inhibición de patógenos en sistemas alimentarios, se requerían concentraciones mayores a ésta; lo cual limita su uso como agente antimicrobiano (Gaysinsky *et al.* 2005).

Stonsaovapak estudió el efecto de nueve especias de Tailandia, entre las que se incluía canela, pimienta negra, pimienta blanca, clavo de olor, anís, entre otras; y se determinó que el clavo de olor fue el que presentó un mayor efecto inhibitorio sobre *Listeria monocytogenes* (Thongson *et al.*, 2005).

Caillet *et al.* (2005) evaluaron el efecto que ocasiona, la radiación sola y en combinación con el aceite esencial del orégano, sobre la composición de la membrana de *Escherichia coli* O157:H7, determinando además el contenido de ATP intra y extracelular. Observaron que tanto la radiación como el aceite del orégano afectan la estructura de la pared celular. Además encontraron que la reducción del ATP intracelular es mayor cuando se combinan ambos factores con respecto a la utilización de radiación únicamente.

Nielsen y Ríos (2000) probaron la eficacia de compuestos antimicrobianos volátiles provenientes del clavo de olor, la canela y el ajo para el control del deterioro del pan ocasionado por hongos. Otros investigadores tales como Bullerman *et al.* (1977) reportaron la actividad antifúngica de algunos aceites tales como eugenol, geraniol, thymol y el aldehído cinámico. También se ha reportado acerca de la actividad antifúngica del aceite esencial del orégano, observándose que una concentración de 1000 ppm de su aceite es capaz de inhibir el crecimiento micelial y la producción de micotoxinas de *Aspergillus ochraceus* y que una concentración de 250-400 µg/ml, inhibe el crecimiento y la germinación de conidias de *Penicillium digitatum* (Portillo, 2005).

Para el ensayo antimicrobiano de los aceites esenciales se han utilizado métodos convencionales aplicados usualmente para los antibióticos (Kalemba y Kunicka, 2003), entre los cuales destacan principalmente dos técnicas básicas que consisten en el método de difusión en agar y el método de dilución en agar o en caldo.

Para la técnica de difusión en agar se utilizan placas de petri con agar donde se inoculan los microorganismos. El aceite esencial se incorpora ya sea mediante discos de papel inmersos

en el aceite o en pocillos hechos en el agar. Posterior a la incubación se estima la efectividad del aceite esencial midiendo la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo y usualmente se expresa el diámetro de la zona en centímetros o en milímetros. Esta es la técnica mas comúnmente utilizada para medir la actividad antibacteriana y antifúngica de los aceites esenciales debido a que es sencilla y requiere pequeñas cantidades del aceite (Kalemba y Kunicka, 2003).

En la técnica de difusión en tubo o en placa, el efecto del aceite esencial es medido turbidométricamente o por medio del conteo de colonias. El resultado se expresa ya sea mediante un índice de inhibición del crecimiento o por medio de la concentración mínima inhibitoria o la concentración mínima letal (Kalemba y Kunicka, 2003).

Además de estas dos técnicas, los investigadores han utilizado otras técnicas no convencionales para evaluar la actividad antimicrobiana de las especias, tales como: el método de microatmósfera que consiste en una ligera modificación del método de difusión en agar, donde el resultado se presenta como el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo o cuantificando la concentración mínima de aceite esencial que inhibe el crecimiento total del microorganismo. También se ha utilizado la turbidometría, sistemas de monitoreo de bioimpedancia, medición del contenido de ATP intra y extracelular, microscopía electrónica para la observación del contenido celular, medición de pH intracelular, entre otros (Lambert *et al.*, 2001; Oussalah *et al.*, 2006).

JUSTIFICACIÓN

La salud pública es una de las razones que han hecho del análisis de la actividad biológica de los aceites esenciales presentes en plantas, hierbas y especias; uno de los temas de mayor interés para una serie de investigadores; principalmente en lo que se refiere a alimentos de consumo humano.

Algunos de los químicos y preservantes utilizados actualmente en una gran variedad de alimentos, son consideradas como sustancias teratogénicas, carcinogénicas y con toxicidad residual. Los consumidores tienden cada vez más a cuestionarse acerca de los aditivos químicos y sintéticos agregados a los alimentos, lo cual ha intensificado la demanda de productos naturales que constituyan una alternativa para la preservación de los alimentos frente a microorganismos patógenos que atentan contra la salud humana.

A pesar de que muchos estudios han determinado que las especias naturales poseen efectos inhibitorios sobre microorganismos patógenos asociados a alimentos; en Costa Rica no se ha estudiado el potencial de las especias propias del país. Es de suma importancia el análisis y comparación de las especias propias con las especias importadas, para determinar así si los diferentes procesamientos que éstas sufren, influye significativamente en su potencial efecto inhibitorio, ya sea aumentándolo o disminuyéndolo.

La demostración de una franca actividad antimicrobiana por parte de las especias, permitirá la implementación de éstas en la industria alimentaria; constituyendo una herramienta alternativa para disminuir el daño y la contaminación de alimentos dada por microorganismos asociados a éstos; y así evitar en cierto grado el uso de sustancias y preservantes químicos artificiales que pudieran tener efectos secundarios perjudiciales para la salud de los consumidores.

II. OBJETIVOS

II. 1. Objetivo general

Determinar la actividad antimicrobiana de la canela, clavo de olor, pimienta y orégano, tanto nacionales como importadas, sobre *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*.

II.2. Objetivos específicos

1. Establecer el potencial efecto inhibitor de especias nacionales e importadas sobre *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*.
2. Comparar el grado de inhibición obtenido por las diferentes especias ensayadas.
3. Comparar el grado de inhibición obtenido según el origen de la especia.
4. Comparar el efecto obtenido de utilizar las especias en disolución o en peso seco.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. 1. Técnica de Difusión en Agar/ Volumen

Las especias importadas fueron adquiridas en un tramo del Mercado Central de San José y las nativas del país en un supermercado ubicado en Naranjo Centro. A partir de las especias en polvo se realizaron diluciones al 100, 75, 50, 25, 12 por ciento en 5ml de agua peptonada estéril al 0.1%. Las especias utilizadas fueron canela, clavo de olor, orégano y pimienta.

Los cultivos de las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* se solicitaron en la Bacterioteca de la Facultad de Microbiología. A partir de dichos cultivos, se tomaron colonias que se inocularon en botellas con 5ml de caldo nutritivo y se incubaron por 24 horas a 37 °C con el fin de multiplicar las bacterias. Posteriormente se hizo una suspensión de cada bacteria en agua peptonada estéril al 0.1% equivalente al estándar 0.5 de McFarland.

El cultivo de *Aspergillus niger* (N.6) fue obtenido de la Micoteca de la Facultad de Microbiología. Dicho cultivo se raspó suavemente con un asa bacteriológica, con el objetivo de obtener las conidias, las cuales se resuspendieron en agua peptonada estéril al 0.1% y se centrifugó el tubo, obteniéndose así el sobrenadante a partir del cual se trabajó.

Se hicieron cinco hoyos de 5mm de diámetro en placas de Agar Sangre. Cada microorganismo se rayó en tres direcciones con una torunda de algodón, en dichas placas. Posteriormente se inocularon 40µl de cada una de las diluciones de las especias en los distintos hoyos.

Las placas inoculadas con bacterias se incubaron a 37 °C por 24 horas; mientras que las placas con hongos se incubaron a temperatura ambiente por 72 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se midió con una regla el halo de inhibición de aquellas placas que lo presentaban.

El procedimiento se realizó por triplicado para los dos tipos de especias.

III.2. Técnica de difusión en agar /Peso

Para la preparación de los microorganismos se utilizó el procedimiento descrito anteriormente.

Se procedió a pesar un gramo de cada una de las especias, para utilizar la cantidad pesada como el inóculo.

A cada placa de Agar Sangre de le hizo un hoyo de 46 mm de diámetro. Se rayó cada microorganismo y se colocaron las especias anteriormente pesadas. Se incubaron bajo las mismas condiciones mencionadas y se midieron los halos de inhibición.

III. 3.Método estadístico

Para comparar los datos obtenidos se aplicó una T-student, utilizando una $P = 0.05$

IV. RESULTADOS

En el Cuadro 1 se observa el promedio de los halos de inhibición generados por las diluciones de las especias importadas sobre los tres microorganismos estudiados.

Cuadro 1. Diámetro promedio en milímetros de los halos de inhibición mostrados por los microorganismos en estudio frente a las distintas diluciones de las especias importadas ensayadas.

Dilución de la especia	<i>E.coli</i> O157:H7	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Canela			
100	0	0	16.7
75	0	0	13.7
50	0	0	11.7
25	0	0	0
12	0	0	0
Clavo olor			
100	8.3	0	17.3
75	7.9	0	13.3
50	6.1	0	10.3
25	0	0	0
12	0	0	0
Orégano			
100	0	9	0
75	0	8	0
50	0	0	0
25	0	0	0
12	0	0	0
Pimienta			
100	0	0	0
75	0	0	0
50	0	0	0
25	0	0	0
12	0	0	0

En el Cuadro 2 se observa el promedio de los halos de inhibición generados por las diluciones de las especias nativas del país sobre los tres microorganismos estudiados.

Cuadro 2. Diámetro promedio en milímetros de los halos de inhibición mostrados por los microorganismos en estudio frente a las distintas diluciones de las especias nativas del país ensayadas.

Dilución de la especia	<i>E.coli</i> O157:H7	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Canela			
100	0	0	11.3
75	0	0	0
50	0	0	0
25	0	0	0
12	0	0	0
Clavo olor			
100	7.8	0	15.3
75	6.0	0	0
50	0	0	0
25	0	0	0
12	0	0	0
Orégano			
100	0	9.5	0
75	0	7.8	0
50	0	7	0
25	0	0	0
12	0	0	0
Pimienta			
100	0	0	0
75	0	0	0
50	0	0	0
25	0	0	0
12	0	0	0

En el Cuadro 3 se observa el promedio de los halos de inhibición generados por las especias importadas en peso seco sobre los tres microorganismos estudiados.

Cuadro 3. Diámetro promedio en milímetros de los halos de inhibición mostrados por los microorganismos en estudio frente a las especias importadas en peso seco.

Cantidad de especia	<i>E.coli</i> O157:H7	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Canela			
1g	62	59	67
Clavo olor			
1g	56	0	>84
Orégano			
1g	0	51	58
Pimienta			
1g	0	0	0

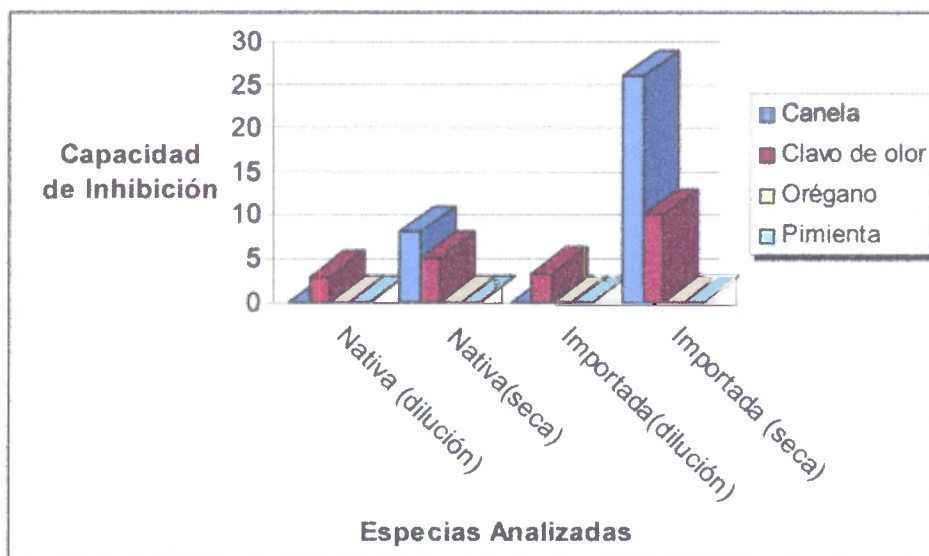
En el Cuadro 4 se observa el promedio de los halos de inhibición generados por las especias nativas del país en peso seco sobre los tres microorganismos estudiados.

Cuadro 4. Diámetro promedio en milímetros de los halos de inhibición mostrados por los microorganismos en estudio frente a las especias nativas del país ensayadas en peso seco.

Cantidad de especia	<i>E.coli</i> O157:H7	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Canela			
1g	54	54	58
Clavo olor			
1g	51	0	56
Orégano			
1g	0	50	49
Pimienta			
1g	0	0	0

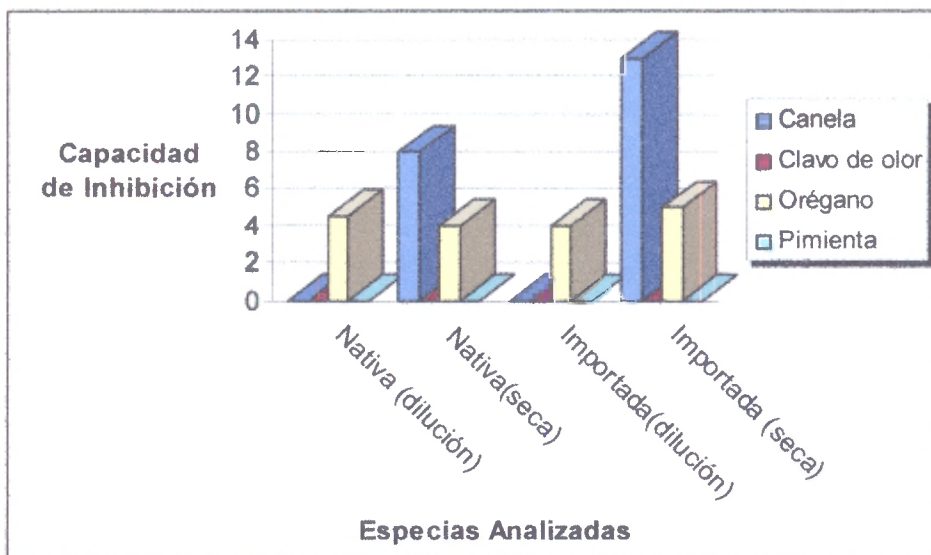
En el gráfico 1 se aprecia el grado de inhibición de cada una de las especias ensayadas contra *E. coli* 0157:H, de forma tal que es posible establecer una comparación tanto con base en el tipo de especia, nativa del país o importada, como en el tipo de metodología utilizada para evaluar el grado de inhibición.

Gráfico 1. Comparación del grado de inhibición de las distintas especias sobre *E.coli* O157:H7



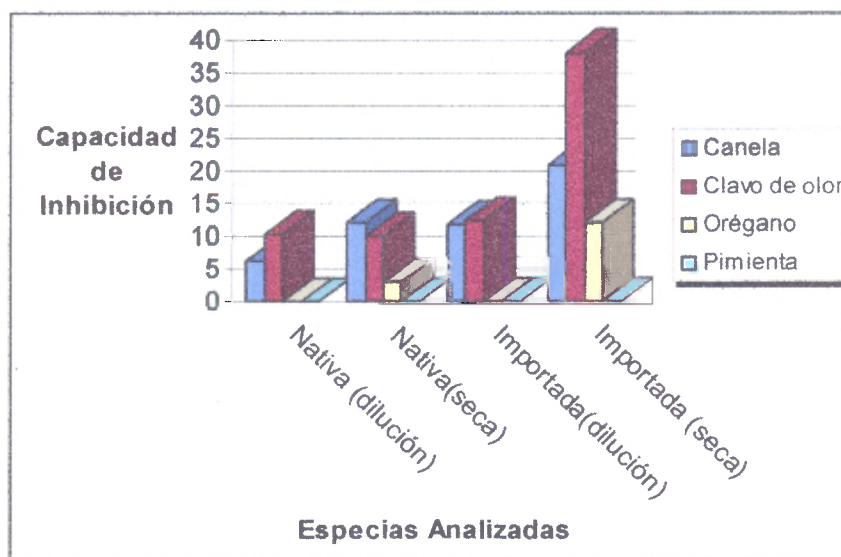
En el gráfico 2 se muestra el porcentaje de inhibición de cada una de las especias ensayadas contra *L. monocytogenes*, permitiendo, de igual forma, establecer una comparación tanto con base en el tipo de especia como al tipo de metodología utilizada para evaluar el grado de inhibición.

Gráfico 2. Comparación del grado de inhibición de las distintas especias sobre *L.monocytogenes*



En el gráfico 3 se muestra el porcentaje de inhibición de cada una de las especias ensayadas contra *Aspergillus niger*, permitiendo, de igual forma, establecer una comparación tanto con base en el tipo de especia como al tipo de metodología utilizada para evaluar el grado de inhibición.

Gráfico 3. Comparación del grado de inhibición de las distintas especias sobre *A. niger*



V. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que tanto la canela como el clavo de olor y el orégano muestran cierto grado de actividad antimicrobiana contra los distintos microorganismos ensayados; mientras que la pimienta no manifestó poder inhibitorio alguno.

A pesar de que estadísticamente no existe una diferencia significativa en cuanto al origen de las especias utilizadas; al comparar los halos de inhibición generados por los cuatro tipos de especias importadas con respecto a las especias nativas, se pudo constatar que las especias importadas presentan un grado de inhibición ligeramente mayor. Lo anterior concuerda con el resultado que se esperaba debido a que las especias importadas pertenecen a una gama de productos elaborados bajo estrictas normas de calidad, incluyendo el tratamiento con óxido de etileno en el proceso de secado con el fin de obtener un producto final libre de microorganismos; además un proceso de molido al vacío que asegura una mayor retención de las sustancias volátiles. (www.baltimorespice.net). En contraste a lo anterior, las especias nativas son secadas al sol, lo cual podría disminuir el poder inhibitorio que estas presentan, pues como ya se ha comprobado, la actividad antimicrobiana de las especias radica en sus aceites esenciales, los cuales son volátiles, por lo que probablemente estas especias contengan una menor cantidad del aceite esencial, en comparación con las importadas.

En base a los resultados obtenidos, las especias que mostraron una mayor actividad antimicrobiana fueron la canela y el clavo de olor, independientemente de su procedencia (importadas o nativas) y de la técnica aplicada (volumen vrs peso seco)

En el caso de la canela aplicada en dilución, únicamente mostró efecto contra *Aspergillus niger*. Esto concuerda con un estudio realizado por Kalemba y Kunicka (2003) donde observaron que los hongos son más susceptibles que las bacterias a algunos aceites esenciales tales como el de la canela, pimienta, milenrama, entre otros. Sin embargo, cuando se utilizó como inóculo un gramo de canela sin diluir, se observó que fue capaz de inhibir a los tres microorganismos en estudio.

El clavo de olor fue capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli* O157H:7 y en mayor grado el de *Aspergillus niger*, tanto en la técnica de difusión en agar/ volumen como con la de difusión en agar /peso.

Al comparar estas dos especias se puede apreciar que para obtener un efecto inhibitorio sobre las bacterias por parte de la canela, se requiere una mayor cantidad de esta; en cambio el clavo de olor fue capaz de inhibir tanto a *E coli* como a *Aspergillus niger* a menores concentraciones. Esto concuerda con algunas publicaciones en las que se ha analizado el poder antimicrobiano de varias especias entre ellas el clavo de olor y la canela, encontrándose que el clavo es el único capaz de inhibir el crecimiento de todos los microorganismos en estudio. (González *et al*, 2005) No obstante, en otras investigaciones se ha encontrado mayor actividad en el aceite de la canela. En vista de las discrepancias entre los distintos estudios incluyendo el presente, se hace necesario recalcar que a la hora de realizar un ensayo de este tipo se deben tener en cuenta ciertas consideraciones como la existencia de diferentes quimiotipos de la misma especie de plantas que pueden crecer en el mismo lugar y dar origen a diferentes aceites con distinta actividad; asimismo es importante tomar en cuenta la parte de la planta de la cual provenga el aceite esencial ya que estas usualmente varían en composición y actividad biológica.

El orégano, mostró cierta actividad antimicrobiana, principalmente contra *Listeria monocytogenes*; lo cual concuerda con estudios en los que observaron que compuestos fenólicos, como el carvacrol y el timol, contenidos en especias como ésta, son generalmente más efectivos contra microorganismos Gram-positivos que contra Gram-negativos.

Por otro lado, la pimienta no mostró efecto inhibitorio contra ninguno de los microorganismos estudiados. Existen pocas investigaciones en las que se haya evaluado su actividad, los cuales muestran actividad antimicrobiana menor, en comparación con otras especias como la canela, el clavo de olor, el ajo, entre otras.

Se ha reportado que los aceites esenciales compuestos principalmente por sustancias fenólicas expresan una actividad antimicrobiana mayor y un espectro de acción más amplio, en comparación con aceites compuestos principalmente por grupos alcohólicos. Lo anterior explica el hecho de que el clavo de olor (que contiene eugenol), la canela (que

contiene aldehído cinámico) y el orégano (conformado por carvacrol y timol); presenten una actividad inhibitoria mayor en comparación con la pimienta cuyo poder inhibitorio radica en compuestos no fenólicos.

Recapitulando de acuerdo al tipo de microorganismo, se observó que el hongo fue inhibido en distinto grado por las tres especias que mostraron actividad antimicrobiana. La bacteria Gram-negativa en estudio, fue inhibida tanto por la canela como por el clavo de olor; y en el caso de la bacteria Gram-positiva ensayada, se mostró ligeramente sensible a la acción de la canela y del orégano.

En lo referente a los dos métodos utilizados para la preparación de las distintas especias en estudio se determinó que en general, los mayores halos de inhibición del crecimiento de los microorganismos, se obtuvieron cuando se utilizó como inóculo un gramo en peso seco de la especia, en comparación con las distintas diluciones realizadas. Este resultado posiblemente se deba a que al utilizar la cantidad pesada como tal se evita diluir el aceite esencial de la especia en cuestión, el cual, de acuerdo a lo reportado en la literatura, se encuentra en bajas concentraciones (Kalemba y Kunicka, 2003). Conjuntamente diversos investigadores han demostrado que se requieren altas concentraciones del aceite esencial para lograr inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos (Gaysinsky *et al*, 2005).

Cabe recalcar que el estudio y evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es difícil debido a su volatilidad, insolubilidad en agar y complejidad en cuanto a su naturaleza hidrofóbica y alta viscosidad. Estas propiedades pueden reducir la capacidad de dilución o causar una distribución desproporcional del aceite a través del medio (Kalemba y Kunicka, 2003).

Distintas investigaciones han determinado una serie de factores que influyen en la estimación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales entre los cuales se encuentran: el método utilizado, tipo y volumen del medio, concentración y edad del inóculo, la cepa de microorganismo en estudio, temperatura, tiempo y atmósfera de incubación y el solvente o agente dispersante utilizado. Además, cuando se aplica el método de difusión en agar se deben considerar otros parámetros tales como: el diámetro del pocillo del disco, la cantidad de aceite esencial, una cantidad específica de

microorganismos y asegurar que éstos alcancen la fase apropiada de crecimiento. Asimismo, en vista de que los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles, se debe contemplar que periodos largos de incubación pueden ocasionar la volatilización o descomposición de alguno de sus componentes.

Es de suma importancia tener presentes cada una de las variables mencionadas anteriormente, ya que cualquier descuido en alguno de estos factores podría crear variabilidad en los resultados, originando diferencias significativas con los resultados reportados en la literatura.

Finalmente es importante considerar que varios estudios han mostrado una menor efectividad de los aceites cuando se aplican a sistemas alimenticios, debido a que los aceites son en su mayoría compuestos hidrofóbicos; razón por la cual su uso como preservante se ha visto limitado a productos que contengan lípidos o grasas en las que el antimicrobiano se disperse. Además, debido a su baja solubilidad y a que los microorganismos en los alimentos en su mayoría están en la fase acuosa, existe una pequeña interacción del aceite esencial con éstos, disminuyendo así su actividad antimicrobiana. A raíz de este problema han propuesto como posible solución el uso de surfactantes que permitan incrementar la solubilidad de los componentes del aceite esencial en la fase acuosa, mejorando con ello la interacción del agente antimicrobiano con los microorganismos. (Gaysinsky *et al*, 2005)

Todo lo anterior demuestra la necesidad de desarrollar nuevos estudios en los cuales se evalúe la eficacia de un agente surfactante en combinación con especias nativas. Conjuntamente, se deben de llevar a cabo análisis tanto en cultivo como en sistemas alimentarios, con el objetivo de obtener resultados que evidencien el uso adecuado, factible y eficiente de las especias como preservantes naturales en la industria alimentaria.

VI. CONCLUSIONES

- A pesar de que los resultados muestran una baja actividad antimicrobiana en comparación con lo reportado en la literatura, se comprobó que la canela, el clavo de olor y el orégano presentan actividad antimicrobiana.
- Aunque resulta necesario la utilización de un conjunto mayor de mediciones para establecer una diferencia significativa, no se observó grandes divergencias en el uso de especias importadas con respecto a las nativas; aun cuando la tendencia es hacia halos de inhibición mayores cuando se utilizan especias importadas.
- Las especias ensayadas cuyo principal componente son los compuestos fenólicos, mostraron una mayor actividad en comparación con la pimienta, compuesta básicamente por constituyentes nitrogenados; de ahí que sea importante tener en cuenta al realizar un estudio de esta índole, el tipo de aceite esencial presente en la especia, ya que este va a determinar la actividad antimicrobiana de ésta. Además, se debe considerar que existen diferentes quimiotipos de la misma especie de planta que proporcionan diferente actividad a los aceites esenciales, lo cual va a influir en los distintos resultados que se obtienen al analizar un tipo determinado de especia.
- Se observó un mayor efecto antimicrobiano al utilizar especias secas en comparación con las diluidas, lo que demuestra que probablemente la dilución del aceite esencial presente en la especia, lleve a una menor actividad antimicrobiana.
- Se requieren nuevos estudios en los que se tomen en cuenta otros aspectos importantes que permitan establecer la actividad antimicrobiana de las distintas especias en un sistema alimentario propiamente, que faculte en última instancia implementar su uso como preservantes naturales.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Arpidae.(2005). Clavo de olor. Noticias a la carta. Edición No 15.

Bullerman, L, Lieu, F y Seire, A. (1977). Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. Journal of Food Science (42), 1107-1116.

Burt, S. y Reinders, R. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology (36), 162-167

Caillet,S; Shareck,F y Lacroix,M. (2005). Effect of gamma and Orégano essential oil on Murein and ATP concentration of *Escherichia coli* O157:H7. Journal and Food Protection. International Association for Food Protection. (68, 12), 2571-2579

Gaysinsky,S; Davidson,P; Bruce,B; y Weiss,J. (2005). Growth inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* by carvacrol and eugenol encapsulated in surfactant micelles. Journal and Food Protection. International Association for Food Protection. (68, 12),. 2559-2556

González, R; Rocha, E y Aranda, J. (2005). Evaluación del efecto bactericida de condimentos, aditivos y conservadores utilizados en alimentos procesados. Revista Salud. Publica y Nutrición.

Greenwood,M; Roberts,D y Burden,P. (1991). The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England and Wals. Internacional Journal of Food Microbiology (12), 197-229

Guynot,M; Ramos,A; Setó,L; Purroy,P; Sanchos,V y Marín,S. (2003). Antifungal activityof volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing

deterioration of bakery products. Journal of Applied Microbiology. The Society for Applied Microbiology. (94), 893-899

Hugo,W. (1991). A review: A brief history of heat and chemical preservation and disinfection. Journal of Applied Bacteriology. (71,9).

Kalemba,D. y Kunicka,A. (2003). Antibacterial and Antifungal properties of essential oils. Current medicinal chemistry (10), 813-829

Lai,P. y Roy,J. (2004) Antimicrobial and Chemopreventive properties of herbs and spices. Current medicinal chemistry (11), 1451-1460

Lambert, R; Skandamis, P; Coote,P y Nychas, G. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology. (91), 453-462

Leuschner, R y Ielsch, V. (2003). Antimicrobial effects of garlic, clove and red hot chilli on *Listeria monocytogenes* in broth model systems and soft cheese. Internacional Journal of Food Sciences and Nutrition. (54), 127-133.

Nakatani,N. (1992). Natural antioxidants from spices. Americal Chemical Society. Washington, DC, 72-86.

Nielsen, P.V. and Rios, R. (2000). Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the posible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. International Journal of Food Microbiology (60), 219-229.

Osaili, T; Griffis,C; Martin,E; Beard,B; Keener A y Marcy, J (2006). Thermal inactivation studies of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken-fried beef patties. Journal of Food Protection. International Association for Food Protection. (69, 5), 1080-1086

Oussalah, M; Caillet, S y Lacroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish Oregano, Chinese Cinnamon, and Savory essential oils against cell membranes and wall of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. International Association for Food Protection. (69, 5), 1046-1055.

Pierre, P y Ryser, E. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* DT 104, and *Listeria monocytogenes* on inoculated alfalfa seeds with a fatty acid – based sanitizer. Journal of Food Protection. International Association for Food Protection. (69, 3), 582- 590.

Piyawan,S. y Limsuwam,S. (2006). Medicinal plant extracts as *Escherichia coli* O157:H7. Agents and their effects on bacterial cell aggregation. Journal of Food Protection. International Association for Food Protection. (69, 10), 2336-2341.

Portillo,M.; Viramontes,S; Muñoz,L; Gastéllum,M y Nevarés, G.(2005). Antifungal Activity of Mexican Oregano. Journal of Food Protection. International Association for Food Protection. (68, 12), 2713-2717

Rivera,M; Shackelford,S; Arthur,T; Westmoreland,K; Bellinger,G; Rossman,M; Reagan,J y Koohmarahie,M. (2004). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. Journal of Food Protection. International Association for Food Protection. (67, 2), 295-302.

Rhee,M; Lee,S; Dougherty, R y Kang,D. (2003). Antimicrobial effects of mustard flour and acetic acid against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. Applied and Environmental Microbiology. (69,5), 2959-2963.

Sabah,J; Juneja,V Y Fung,D.(2004). Effect of spices and organic acids on the growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked ground beef. Journal of Food Protection. International Association for Food Protection. (67, 9), 1840-1847.

Samadpour,M; Barbour,M; Nguyen,T; Cao,T; Back,F; Depavia,G; Mazengia,E; Yang,P; Alfi,D; Lopes,M y Stopforth,J. (2006). Incident of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in retail fresh ground beef, sprouts and mushrooms. Journal and Food Protection. International Association for Food Protection. (69, 2), 441-443

Santoyo,S; Cavero,S; Jaime,L; Ibáñez,E; Señorans,F; y Reglero,G. (2006). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of compounds with antimicrobial activity from *Origanum vulgare* L.: Determination of optimal extraction parameters. Journal and Food Protection. International Association for Food Protection. (69, 2), 369-375

Seaberg, A; Labbe,R y Shetty, K (2003). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by elite clonal extracts of Oregano (*Origanum vulgare*). Food Biotechnology. (17,2), 129-149.

Sivropoulou,A; Papanikolaou,E; Nikolaou,C; Kokkini,S; Lanaras,T y Arsenakis,M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. Journal of Applied Microbiology. (44), 1201-1206.

Thongson,C; Davidson,P; Mahakarnchanakul,W y Vibulsresth,P. (2005). Antimicrobial effect of Thai spices against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* DT104. Journal and Food Protection. International Association for Food Protection. (68, 10), 2054-2058

Yuste,J. y Fung,C. (2004) Inactivation of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice by a combination of nisin and cinnamon. Journal and Food Protection. International Association for Food Protection.(67, 2), 371-377.

<http://www.baltimorespice.net>.