



# Efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A y *Bacillus cereus*

## Effect of *Syzygium aromaticum* essential-oil on *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A and *Bacillus cereus* survival

Jessenia M. Gamboa Anticona y María N. Vásquez Valles

<sup>1</sup>Tesista Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

### RESUMEN

Se evaluó el efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” en la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A y *Bacillus cereus*. La extracción del aceite esencial (AE) se realizó a partir de brotes de clavo de olor usando el método de destilación por arrastre con vapor de agua. Se prepararon concentraciones del aceite al 10%, 20%, 30% y 40% más Tween 80 como solvente emulsificante. Se emplearon cada uno de los cultivos de *S. typhi*, *S. paratyphi* A y *B. cereus* y se estandarizaron a una turbidez equivalente a  $1.5 \times 10^8$  células/mL del nefelómetro de MacFarland, los cuales constituyeron los inóculos. El efecto del AE sobre los microorganismos se determinó por el método de difusión en agar utilizándose concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40% de aceite; utilizando cloranfenicol (30ug/disco) como control positivo y Tween 80 como control negativo. Se encontró una relación directa entre la concentración del aceite y el efecto inhibitorio: a mayor concentración (40%) mayor efecto inhibitorio sobre los microorganismos en estudio. Se concluye que el AE evaluado presenta un notable efecto inhibitorio en la supervivencia de *S. typhi*, *S. paratyphi* A y *B. cereus*.

**Palabras clave:** Supervivencia, aceite esencial, *Syzygium aromaticum*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A, *Bacillus cereus*.

### ABSTRACT

Effect of essential oil of *Syzygium aromaticum* "clove" on *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A and *Bacillus cereus* survivals was evaluated. The extraction of essential oil (AE) was performed from clove buds using the Distillation with steam method. Likewise, oil concentrations were prepared at 10%, 20%, 30% and 40% plus Tween 80 as an emulsifier solvent. Cultures of *S. typhi*, *S. paratyphi* A and *B. cereus* were used and were standardized to a turbidity equivalent to  $1.5 \times 10^8$  cells / mL, which constituted the inoculum. The sensitivity of these microorganisms was determined by the agar diffusion method used in concentrations of 10%, 20%, 30% and 40% oil; using chloramphenicol (30ug/disco) as positive control and Tween 80 as negative control. It was found that 40% of the oil in test compared with chloramphenicol has a greater inhibitory effect on the survival of *B. cereus*. Likewise, it was demonstrated that the concentration of 40% of the oil in the study, it exerts an antibacterial power *S. typhi*, *S. paratyphi* A and *B. cereus* survival compared to the other concentrations employed. It was concluded that the assessed AE presents a remarkable inhibitory effect on the survival of *S. typhi*, *S. paratyphi* A and *B. cereus*.

**Keywords:** Survival, essential oil, agar diffusion, *Syzygium aromaticum*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A and *Bacillus cereus*.

## INTRODUCCIÓN

Los patógenos microbianos en alimentos han sido confirmados como la causa principal de las enfermedades transmitidas por estos productos en Latinoamérica y el Caribe<sup>1,2</sup>. La contaminación de los alimentos, en la mayoría de los casos, suele ocurrir después de ser cocidos y no ser conservados adecuadamente, lo que favorece la multiplicación de los microorganismos<sup>3</sup>. Microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* son reconocidos como patógenos causantes de enfermedades y graves intoxicaciones alimentarias, generando un gran impacto sobre la salud pública<sup>2,4</sup>. 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 alimentarias<sup>3</sup>.

Dentro de los procedimientos de control de microorganismos patógenos más utilizados están los tratamientos térmicos de pasteurización y esterilización, la irradiación UV, almacenamiento a bajas temperaturas como congelación y refrigeración, así mismo el uso de conservantes químicos<sup>4,5,6</sup>; sin embargo, no todos son 100% eficientes contra todos los microorganismos ni se pueden utilizar sobre todos los productos<sup>7,8</sup>.

Como alternativa a los conservantes sintéticos, los aceites esenciales prometen competir con el amplio mercado de los agentes sintéticos que actualmente ofrecen productos económicos, de aplicación sencilla y amplio espectro, pero que están destinados a desaparecer porque se ha demostrado que algunos de estos son altamente tóxicos para el hombre y los animales, así mismo son bioacumulables, y después de un largo tiempo de aplicación son inactivos para muchos microorganismos patógenos<sup>9,10</sup>.

Las propiedades antimicrobianas de hierbas y especias han sido reconocidas y usadas desde tiempos antiguos en la preservación de los alimentos y en la medicina, pero científicamente confirmado hace pocos años <sup>[11]</sup>. Los aceites esenciales poseen actividad antimicrobiana por lo cual los convierte en una opción atractiva para la sustitución de conservantes sintéticos, los que al ser añadidos van a cambiar o mejorar el sabor de los alimentos <sup>[12]</sup>. Sin embargo, la aplicación de aceites esenciales como conservantes de alimentos requiere un conocimiento detallado de sus propiedades, es decir, su modo de acción y el efecto de los componentes en la matriz de los alimentos<sup>13,14,15,16,17,18,19</sup>.

Se conocen aproximadamente 3000 aceites esenciales, de los cuales 300 son comercialmente importantes en el mercado de las fragancias, sus componentes activos de los aceites esenciales pueden variar en su composición, ya que éstos pueden verse afectados por ciertas variables como el genotipo de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas<sup>15,16,17,20</sup>.

*Syzygium aromaticum* ("clavo de olor") ha sido reconocido como analgésico, antiséptico, carminativo, antibacteriano y antifúngico<sup>14,18,19,20</sup>. Es un producto natural obtenido por destilación de tallos, flores y hojas trituradas de la planta del clavo, cuyo principal ingrediente activo es el eugenol (85-95 % del total/ 4-alil-2-vaselina); está compuesto además por acetileugeno,  $\alpha$  y  $\beta$  cariofilenos y pequeñas cantidades de ésteres, cetonas y alcoholes<sup>22</sup>. Como antiséptico, la acción de los aceites esenciales es similar a un efecto bacteriostático; sin embargo, algunos de sus componentes químicos parecen tener propiedades bactericidas<sup>19,21</sup>.

Las bacterias Gram negativas son generalmente menos susceptibles a los aceites esenciales que las bacterias Gram positivas. La membrana externa de las bacterias Gram negativas contienen lipopolisacáridos hidrófilos, que crean una barrera hacia macromoléculas y compuestos hidrófobos, proporcionándoles una mayor tolerancia hacia compuestos antimicrobianos hidrófobos como los que se encuentran en los aceites esenciales<sup>23</sup>. Las altas concentraciones de los aceites esenciales puede afectar las propiedades organolépticas de los alimentos, las bajas concentraciones puede ser suficiente para la seguridad alimentaria en las situaciones donde la carga bacteriana es baja, además del agradable sabor que es impartida a la comida<sup>24</sup>.

Dentro de las bacterias Gram negativas que ha cobrado interés en la contaminación de alimentos es *Salmonella* spp. Las especies de este patógeno son quimioorganótrofas, con habilidad para metabolizar nutrientes por las vías fermentativas y respiratoria<sup>25</sup>. Las bacterias crecen óptimamente a 37°C y pueden catabolizar la D-glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido y gas; estos microorganismos son oxidasa negativos y catalasa negativos, crecen en citrato como única fuente de

carbono, generalmente producen ácido sulfhídrico, descarboxilan la lisina y ornitina, y no hidrolizan la urea<sup>26</sup>.

Las frutas y verduras han ganado notoriedad en años recientes como fuentes de salmonelosis humana. Esto se presenta como una consecuencia de diversos factores como: la fertilización de sembríos con lodos sin tratamiento o efluentes de drenajes potencialmente contaminados con *Salmonella* spp. resistente a antibióticos, la irrigación de los campos y el lavado de frutas y verduras con aguas contaminadas, la manipulación excesiva por los trabajadores, la exposición a la contaminación ambiental de especias y condimentos durante el secado y la resistencia del microorganismo a valores de pH bajos<sup>27,28,29,30,31</sup>.

*Bacillus cereus*, por su lado, es una bacteria Gram positiva que causa enfermedad bajo dos formas clínicas: intoxicación emética por ingestión de toxinas presentes en el alimento o una infección diarreica debida a una ingestión de bacterias o esporas que crecen en los intestinos produciendo toxinas<sup>19,27</sup>.

Decker et al.<sup>22</sup> reportaron un amplio espectro de actividad bacteriostática del clavo de olor contra *E. coli* y *L. monocytogenes*, resultando efectiva las dosis empleadas 20 y 40 % respectivamente; Yossa et al.<sup>5</sup> evaluaron el efecto in vitro del clavo a un 10% sobre cepas de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. y Sánchez<sup>11</sup> demostró concretamente que derivados fenólicos tales como carvacrol y eugenol, provenientes del clavo y tomillo, a concentraciones 20 uL, causan la desintegración de la membrana de *E. coli* y *S. typhimurium*, demostrándose así que las bacterias gram negativas son menos susceptibles que las gram positivas. Así también, se conoce que el eugenol, posee una buena actividad antibacteriana; asimismo, Hao et al.<sup>14,15</sup> encontraron que el clavo de olor a 10 % fue muy efectivo contra *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophilla* en carne cocida refrigerada; sin embargo su poder inhibidor fue menor al de la canela a 10%.

Por lo anterior, son pocas las investigaciones en las que se ha determinado el efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* contra *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A y *Bacillus cereus*. En tal sentido, lograr que la población disponga de alimentos rigurosamente libre de patógenos o contaminantes, es un propósito de muchos investigadores, además hace un bien a la Salud Pública, de allí el interés científico por investigar y descubrir nuevas alternativas viables para la síntesis y producción de antimicrobianos de origen natural, como el aceite esencial de *Syzygium aromaticum*, que es una alternativa viable debido a su alto rendimiento, fácil extracción porque no requiere tecnología sofisticada, permite la explotación de recursos naturales, abundantes y renovables, no contamina el ambiente, buen antioxidante, no genera resistencia bacteriana, y no requiere elevadas concentraciones. En tal sentido, la presente investigación está dirigida a determinar el efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A y *Bacillus cereus* en el laboratorio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material Biológico

- 1 Kg de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor”
- cultivos de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A y *Bacillus cereus*, proporcionados por el Laboratorio de Microbiología y Tecnología de Alimentos, de la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

### Obtención de *Syzygium aromaticum*

Los brotes de *Syzygium aromaticum* fueron adquiridos del Mercado Zonal Palermo (Ex Mercado Mayorista) distrito de Trujillo provincia de Trujillo, departamento La Libertad-Perú.

### Transporte y conservación de *Syzygium aromaticum*

Los brotes se llevaron al Laboratorio de Investigación N° 04 de la Facultad de Ingeniería Química, posteriormente, se envolvió en papel de molde hasta el momento de la extracción del aceite.

### Pesado de *Syzygium aromaticum*

Se pesaron 500 g de brotes de *Syzygium aromaticum* en una balanza mecánica.

**Extracción del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* [28,29]- Método: Destilación por Arrastre de Vapor**

- Se depositaron 500 g de brotes de *Syzygium aromaticum* en un balón de fondo redondo de 1000 mL de capacidad.
- Se procedió a llenar con agua el balón destilador, previa instalación del conducto refrigerante, cabe resaltar que el extremo superior de este balón fue conectado a un condensador, haciéndose circular el agua a través del mismo.
- Se llevó a calentamiento hasta ebullición, el balón conteniendo agua por un tiempo de tres horas hasta desprendimiento de un líquido inmiscible conteniendo vapor de agua condensada y el aceite vegetal, que fueron recolectados en embudos de decantación.
- Se eliminó el agua contenido en el embudo de decantación.

#### **Conservación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum***

El aceite esencial obtenido se colectó en viales de color ámbar y se conservó a temperatura de refrigeración a 10 °C<sup>20</sup>.

#### **Reactivación, purificación y siembra**

- Cada uno de los cultivos bacterianos se sembraron en 4 ml de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) respectivamente y se incubaron a 37°C durante 12 horas.
- Después del período de incubación se sembró una alícuota del cultivo de *Bacillus cereus* en Agar Selectivo para *Bacillus cereus* y los cultivos de *S. typhi* y *S. paratyphi A* se sembraron en Agar Salmonella Shigella. Posteriormente cada uno de los cultivos se llevó a incubar a 37° C durante 24 horas.
- Se seleccionaron colonias que presentaron características culturales propias a cada microorganismo en estudio. A partir de cada una de las colonias, se tomó una azada y se realizó la coloración Gram, observándose a 100x.
- Una vez comprobada la pureza del cultivo, de la parte restante de la colonia aislada se sembró en agar nutritivo semisólido inclinado.

#### **Preparación del inóculo<sup>30,31</sup>**

Cada uno de los cultivos bacterianos se sembraron en placas conteniendo Plate Count Agar (PCA) y se incubaron a 37°C durante 18 horas.

#### **Estandarización de los inóculos bacterianos**

Se realizó una suspensión en 5 mL de Agua Destilada Estéril (ADE). A una turbidez equivalente al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ mL). A esta suspensión se le denominó inóculo.

#### **Preparación de las concentraciones del aceite esencial de *Syzygium aromaticum***

A partir del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* y usando Tween 80 como agente emulsificante, se prepararon concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40%.

#### **Determinación de la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A***

##### **Método de Difusión en Agar Kirby- Bauer<sup>32</sup>**

- En tres placas Petri con 20 mL de Agar Müller Hinton, se sembró 100uL del inóculo de *Salmonella typhi* sobre la superficie del medio de cultivo.
- Las placas se llevaron a secar en la estufa por 10 minutos.
- A cada placa se le realizó 5 orificios de 5 mm de diámetro cada uno utilizando un sacabocado estéril, a una distancia de 3 cm con respecto al otro. A 4 orificios se le añadió 100 uL de cada una de las concentraciones de aceite esencial, al 5 orificio siguiente, se le adicionó 100 uL de Tween 80 como control negativo; así mismo, en la misma placa se utilizó un disco de cloranfenicol (30ug) como control positivo.
- En la otra placa se colocó 100uL de Tween 80 como control negativo; y cloranfenicol (30ug/disco) siendo este el control positivo.
- Las placas sembradas se dejaron una hora, con la finalidad de permitir una mejor difusión del aceite en el agar.
- Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas.

#### **Lectura**

- La lectura de los resultados se realizó en base a la presencia de halos de inhibición del crecimiento (en milímetros), formados alrededor de cada pocillo por efecto de la actividad antibacteriana del aceite esencial a concentraciones de 10% ,20%, 30% y 40% y luego se les restó los 5 mm. del pozo.

- Las mediciones se realizaron en 4 direcciones y se sacó el promedio.
- Se continuó con el mismo procedimiento y por triplicado para el cultivo de *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus*.
- Las placas presentaron actividad antibacteriana significativa (definida como una zona clara perfecta con un diámetro  $\geq 18$  mm para el cloranfenicol, Intermedia si es 13-17 y Resistente  $\leq 12$ ) [33,34].

#### **Determinación de la supervivencia de *Bacillus cereus***

Se realizó de acuerdo al ítem 2.11

#### **Análisis Estadístico**

El procesamiento y análisis de los resultados obtenidos para la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* que se presenta para *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus* se efectuó mediante el programa SPSS versión 18.0. Para realizar los análisis se tuvo en cuenta los valores promedio de inhibición de cada concentración del aceite esencial evaluado; ya que se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Posteriormente, se realizó el análisis de varianza, específicamente una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis Test; así mismo, a los datos obtenidos para determinar las diferencias significativas en la actividad antibacteriana entre los tres grupos de bacterias así como con el antibiótico utilizado (control positivo). La significancia se reportó con un nivel de confianza del 95%.

## **RESULTADOS**

Los resultados del efecto del aceite esencial de *S. aromaticum* sobre la supervivencia de *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus* se muestran en la Fig. 1: se presenta la comparación de promedios de los halos de sensibilidad (mm) entre las bacterias a concentraciones (10%, 20%, 30% y 40%) del aceite esencial y del grupo control “Cloranfenicol, observándose el promedio de la medición de los halos de inhibición del crecimiento (mm) de *S. typhi* por acción de diferentes concentraciones 10%, 20%, 30% y 40% del aceite esencial y del grupo control “Cloranfenicol”, se evidencia la existencia de diferencia significativa entre estos grupos, siendo la concentración del 40% de aceite esencial de *S. aromaticum* la de mayor efecto en relación al Cloranfenicol ( $p < 0.05$ ). Asimismo, se muestra los halos de inhibición de crecimiento (mm) de *S. paratyphi A* por acción de diferentes concentraciones (10%, 20%, 30% y 40%) del aceite esencial y del grupo control “Cloranfenicol”, se observa la existencia de diferencia significativa entre estos grupos, siendo la concentración del 40% de aceite esencial de *S. aromaticum* la de mayor efecto en relación al Cloranfenicol ( $p < 0.05$ ).

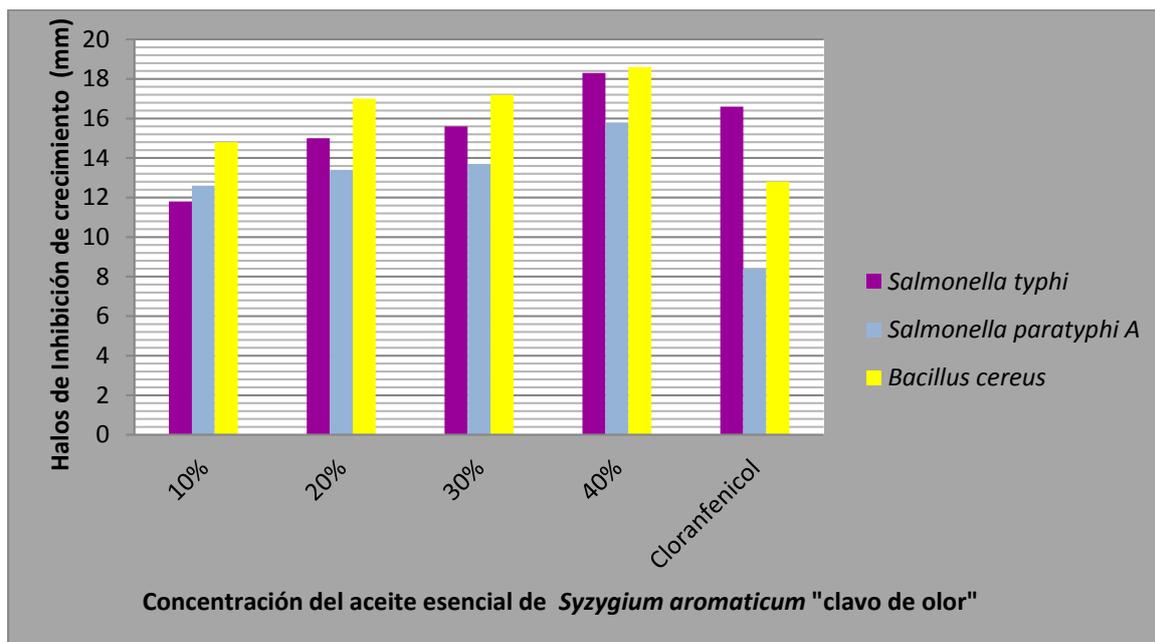
También, se muestra los halos de inhibición de crecimiento (mm) de *B. cereus* por acción de diferentes concentraciones (10%, 20%, 30% y 40%) del aceite esencial y del grupo control “Cloranfenicol”, se observa la existencia de diferencia significativa entre estos grupos, siendo la concentración del 40% de aceite esencial de *S. aromaticum* la de mayor efecto en relación al Cloranfenicol ( $p < 0.05$ ).

## **DISCUSIÓN**

Muchos estudios en el mundo se han realizado con los aceites esenciales obtenidos de diferentes plantas clasificadas como medicinales o como especias; la intención de estos estudios ha sido diferente en el sentido de buscar compuestos que inhiban el crecimiento ya sea de bacterias, hongos, virus y parásitos en alimentos, en aguas residuales o también para ser utilizados como medicamentos.

Hoy en día existe una demanda significativa de los consumidores por los alimentos que son mínimamente procesados y libres de conservantes químicos de síntesis con la percepción de ser “natural”; como resultado, la industria alimentaria se enfrenta a grandes desafíos para producir alimentos naturales, es por ello, han surgido investigaciones que utilizan los aceites esenciales como conservantes naturales.

En la Figura N°1, se observa que para *S. typhi*, el halo de inhibición formado por la concentraciones de 10, 20 y 30% del aceite de *S. aromaticum*, fueron de 11.8mm, 15.0mm, y 15.6 mm (Ver anexo 2), respecto al halo de sensibilidad formado por Cloranfenicol que fue de 16.6 mm; esto denota que su actividad antibacteriana es menos eficaz comparado con el patrón cloranfenicol ( $P > 0.05$ ).



**Fig. 1.** Comparación de promedios de los halos de inhibición de crecimiento (mm) de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus* a concentraciones de 10, 20, 30, y 40% de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* y del grupo de control "Cloranfenicol".

La mayor zona de inhibición de *S. typhi* se obtuvo con la concentración de 40%, cuyo halo de inhibición fue de 18.3 mm (Ver anexo 02) siendo mucho mayor con respecto a su control (16 mm). Este resultado permite asegurar que *S. typhi* es significativamente más sensible a la concentración de 40% del aceite esencial de *S. aromaticum*, que al antibiótico Cloranfenicol; por lo que resultó con  $p < 0.05$ , lo cual indica la existencia de diferencia significativa entre el halo de inhibición formado por el aceite al 40% y el formado por Cloranfenicol. Siendo esta concentración eficazmente sensible para *S. typhi*.

El efecto del aceite esencial de *S. aromaticum* sobre la supervivencia de *S. paratyphi A* es menor a las concentraciones de 10, 20 y 30%, con halos formados 12.6, 13.4 y 13.7 mm respectivamente; así mismo, presentan mayor diámetro, en comparación con el halo de inhibición de crecimiento formado por el antibiótico Cloranfenicol (control) que fue de 8.4 mm, aunque producen efecto inhibitorio en la bacteria, no son concentraciones eficaces en relación al antibiótico ( $p > 0.05$ ), esto se interpreta que el halo de sensibilidad formado a dichas concentraciones no es significativamente eficaz para *S. paratyphi A*. Sin embargo la concentración de 40%, formó diámetro de 15.8mm, mucho mayor con respecto a su control (8.4mm), por lo que resultó con  $p < 0.05$ , lo cual indica la existencia de diferencia significativa entre el halo de inhibición formado el aceite al 40% y el formado por el control positivo. Siendo esta concentración eficazmente sensible para *S. paratyphi A*.

Se observa que *B. cereus* es sensible frente a las concentraciones de 10, 20 y 30% del aceite de *S. aromaticum*, pues se observa la formación de halos de inhibición de 14.8, 17.0 y 17.2mm respectivamente; pero el diámetro de estos halos, es mayor en comparación con el halo de sensibilidad formado por el antibiótico Cloranfenicol (control) que fue de 12.8 mm, aunque producen sensibilidad en la bacteria, no son concentraciones eficaces. Así mismo, la concentración de 40%, formó diámetro de 18.6 mm, mucho mayor con respecto a su control, por lo que resultó con  $p < 0.05$ , lo cual indica la existencia de diferencia significativa entre el halo de inhibición formado el aceite al 40% y el formado por el control positivo. Siendo esta concentración eficazmente sensible para *B. cereus*.

Así mismo, en la Figura N° 01. los promedios de los halos de inhibición de crecimiento de *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus* frente a cada concentración (10, 20, 30 y 40%) del aceite esencial de *S. aromaticum*, existiendo diferencia significativa entre ambas bacterias, es decir una de las bacterias

presenta menor supervivencia frente al aceite esencial, resultando que *B. cereus* es más sensible al aceite de *S. aromaticum* a las concentraciones de 10, 20, 30 y 40% en comparación con la supervivencia de *S. typhi*, *S. paratyphi A* que presentan menor inhibición de crecimiento frente a las mismas concentraciones. Los resultados obtenidos son coherentes y se relacionan con los hallados por Friedman y col. quienes analizando aceite de clavo, sobre *Salmonella enterica*, encontraron que clavo de olor fue uno de los más efectivos a concentración del 50%. Adicionalmente, este aceite evidenció inhibición frente a *B. cereus*, *E. coli* y *Ps. Aeruginosa*<sup>25, 26</sup>.

También se evidenció que *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus* no son sensibles al control negativo, Tween 80, ya que no se observó la formación de halos, mostrando la resistencia de estos microorganismos al emulsificante.

Investigadores señalan que existe una relación entre las estructuras químicas de los más abundantes en el aceite esencial y la actividad antimicrobiana. Considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es muy probable que su actividad antibacteriana, no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos, en el caso de *S. aromaticum* la actividad antibacteriana se debe a que el eugenol, actúa inhibiendo la producción de enzimas intracelulares, tales como, amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular<sup>19, 28</sup>. El presente trabajo, concuerda con lo encontrado por Gutiérrez 2006 y Huerta 2007, en el cual concentraciones de 30 % de aceite esencial de clavo poseen mayor actividad antibacteriana frente a *S. typhimurium*.

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de los componentes del aceite, se sabe que los sitios de acción en la célula bacteriana incluyen la membrana celular, pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético, todos ellos estratégicos para la supervivencia de los microorganismos y cualquier acción sobre ellos puede inactivar a la célula bacteriana<sup>30, 33</sup>.

El resultado de la comparación de los halos de inhibición entre *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus* difieren en varios aspectos de otros con respecto a la estructura de sus paredes celulares, principalmente a la presencia de lipoproteínas y lipopolisacáridos en bacterias Gram negativas que forman una barrera para los compuestos hidrófobos<sup>29, 36</sup>. Los aceites esenciales se introducen a través de los lípidos de la membrana celular y mitocondrial, alterando su estructura y haciéndolas más permeables. Como consecuencia tiene lugar una fuga de iones y de otros contenidos celulares, de forma más o menos intensa, que puede llevar a la muerte celular<sup>34, 35</sup>. En su mayoría las gram-negativas son más resistentes a los aceites esenciales que las bacterias Gram-positivas<sup>36</sup>.

El eugenol es el principal componente del aceite del clavo<sup>11</sup>. Huertas<sup>34</sup> encontró que a concentraciones subletales de eugenol inhibe la producción de amilasa y proteasas de *B. cereus*, deteriorando la pared celular, lo que origina la lisis celular. Los aceites esenciales compuestos principalmente por sustancias fenólicas, como el aceite del clavo de olor, expresan una actividad inhibitoria 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) posee una actividad antibacteriana mayor a diferencia de compuestos no fenólicos<sup>26, 34</sup>. En la presente investigación, este compuesto fenólico mostró distintos niveles de inhibición del crecimiento cuando se utilizaron por separado frente a *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus*.

El hecho de que las bacterias Gram (-) sean menos susceptibles a la acción de los AE quizás sea debido a que la membrana externa que poseen y que rodea la pared celular el cual restringe la difusión de compuestos hidrofóbicos a través de la membrana; así mismo, la compleja composición de los AE puede variar en función de las condiciones de crecimiento de cultivo de la planta, del modo de extracción del mismo, y de otros factores que hacen que éstos tengan diferente grado de actividad antibacteriana<sup>32</sup>.

En aquellos aceites esenciales que han presentado mayor capacidad inhibitoria se han encontrado como mayores componentes del mismo, compuestos tales como el timol, el carvacrol, el linalool, el aldehído cinámico, la alicina y el eugenol<sup>25, 36</sup>; dichos aceites en las bacterias, por su acción lipofílica tienen la capacidad de pasar las membranas celulares, romper polisacáridos, ácidos grasos y lípidos, permeabilizando la membrana celular; esta permeabilización, conduce a la pérdida de iones, al colapso de la bomba de protones y a la disminución del ATP lo cual inevitablemente conduce a la muerte celular; también se ha encontrado que a nivel citoplasmático puede actuar sobre lípidos y proteínas coagulando dichas moléculas<sup>4, 32</sup>. Otros estudios han concluido además, que son más sensibles las

bacterias Gram positivas que las Gram negativas, y este efecto está asociado con aceites esenciales que contengan carvacrol y timol los cuales tienen mayor rendimiento antibacterial [24, 25].

*S. typhi* y *S. paratyphi A* presentaron menor inhibición al aceite esencial de *S. aromaticum*, que *B. cereus*, ésta diferencia se debería a la estructura de sus membranas, ya que, las Gram negativas (*S. typhi* y *S. paratyphi A*), poseen una pared celular más compleja compuesta por dos capas situadas por fuera de la membrana citoplasmática, la primera y más cercana a la membrana es similar (más delgada) a la de las bacterias Gram positivas, está constituida por péptidoglicanos, la segunda denominada membrana externa está constituida por fosfolípidos con ácidos grasos saturados y entre las dos capas se halla un espacio periplásmico rico en enzimas, esta estructura les confiere un mayor grado de resistencia a los agentes antimicrobianos<sup>31,33</sup>, además poseen mecanismos de defensa como: presencia de b-lactamasas, modificación enzimática del agente antimicrobiano, cambios en la permeabilidad de la membrana externa debida a la presencia de bombas de expulsión, etc, que generan dificultades para encontrar sustancias que sean efectivas contra ellas<sup>31,35</sup>. Así mismo, Burt y Reinders<sup>36</sup> propusieron que el aceite esencial de clavo ejerce su efecto antimicrobiano sobre los fosfolípidos en la capa externa de la membrana celular de las bacterias, provocando la formación de poros y afectando la permeabilidad de la membrana.

Se observa que el efecto inhibitor del aceite esencial de *S. aromaticum* para *B. cereus* es mayor al compararlos con los demás microorganismos evaluados, posiblemente esto puede deberse a la estructura de su pared celular ya que como es un microorganismo Gram positivo es menos complejo, pues está compuesto por una membrana citoplasmática y una capa gruesa de peptidoglucano en comparación con las bacterias Gram negativas que tienen una pared más compleja, posee una membrana citoplasmática, una delgada capa de peptidoglucano, lipopolisacáridos y proteínas<sup>32,36</sup>.

En relación a *B. cereus*, son escasos los estudios publicados para esta bacteria; sin embargo, la actividad biológica demostrada en este estudio coincide con los resultados obtenidos previamente en donde se determinó que *E. coli* a una concentración de 0.4% y a una temperatura de 21°C reducen la población microbiana en un logaritmo 5 el cual es más sensible comparado con *S. aureus* y *Ps. aeruginosa* así como que las bacterias Gram negativas: *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. cholerae suis* y *V. cholerae* y las bacterias Gram positivas: *S. aureus* y *B. cereus*, mostraron diferentes grados de sensibilidad, concluyendo en que el aceite de *S. aromaticum* posee un amplio espectro contra todas las bacterias Gram positivas evaluadas que contra las Gram negativas<sup>34,36</sup>.

Pocos trabajos describen el uso de este aceite como alternativa, sin embargo en este estudio se puede observar que la actividad antimicrobiana de este aceite esencial es de amplio espectro inhibiendo el crecimiento de *B. cereus* (Gram positiva); así mismo para *S. typhi* y *Salmonella paratyphi A* (Gram negativas) encontrándose relación con lo informado en trabajos anteriores que encontraron actividad de los aceites esenciales de las plantas sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas<sup>26,31,32</sup>.

En general, los aceites esenciales poseen fuertes propiedades antibacterianas debido a que contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como el eugenol<sup>12,13,14</sup>. Lo anterior sugiere que su mecanismo de acción, sea similar al de otros compuestos fenólicos, por alteración de la membrana citoplasmática, interrumpiendo la fuerza motriz de protones (PMF), el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación del contenido celular<sup>15</sup>.

La eficacia de los aceites esenciales contra patógenos transmitidos por alimentos depende de la molécula activa, también se debe mencionar que la composición química de los aceites esenciales puede variar en gran medida para una especie de planta en particular<sup>36</sup>. Esto puede ser una posible explicación de la variabilidad de los resultados obtenidos de un experimento a otro. Por otra parte, todo el aceite esencial puede tener una mayor actividad antimicrobiana que su mayor componente aislado. Existe la posibilidad de que un patógeno de transmisión alimentaria desarrolle resistencia a los aceites esenciales. Sin embargo, el riesgo de desarrollo de resistencia contra aceites esenciales sigue siendo muy poco frecuente<sup>33</sup>.

La evaluación de la combinación de agentes antimicrobianos es necesaria debido a que un microorganismo puede ser resistente a la inhibición y/o eliminación por dosis convencionales de un solo antimicrobiano, pero al ser expuesto a una combinación de agentes se puede vencer su resistencia.

Por lo que se puede afirmar que el aceite esencial de *S. aromaticum*, presenta efectos inhibitorios en la sobrevivencia de *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus* lo que podrían ser una alternativa como preservadores de alimentos. Estos resultados contribuyen en dar respuestas a las necesidades de los gobiernos, agencias regulatorias, fabricantes de alimentos y consumidores; frente al uso de agentes conservantes de alimentos de origen natural, que aseguren la inocuidad y la calidad de anaquel de los

alimentos procesados, en un ámbito de salud pública que se caracteriza en la actualidad por incremento de la resistencia a antibióticos de los microorganismos, mayor toma de conciencia de los consumidores frente a lo que consumen y la globalización de las ETA por causa de la globalización de los mercados alimentarios<sup>14,29</sup>.

## CONCLUSIONES

- La mayor concentración del aceite de *Syzygium aromaticum* tiene mayor efecto inhibitorio sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus*.
- La supervivencia de *Bacillus cereus* es menor frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* que *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi A*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Herrera F, García R. Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas 2006; 4:13-19.
2. Demo M, Oliva M, Lopez M, Zunino M, Zygadlo J. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. Pharm Biol 2005; 43: 129-134.
3. Pilco S, Quito M, Quispe S. Conservación de pan artesanal Ezequiel y pan superbuono usando aceite esencial de clavo de olor (*Eugenia caryophyllus*). Revista de investigación universitaria 2009; 1(1): 12-17.
4. Prabuseenivasan S, Jakakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine 2006; 6:39-47.
5. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology 2004; 94(22): 223-253.
6. Bassolé IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules 2012; 17(4): 3989-4006.
7. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Revista de Facultad de Medicina 2001; 62(2): 156-161.
8. Ardilla M, Vargas A, Pérez J, Mejía L. Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. Biosalud 2009; 8: 47-57.
9. Domingo D, López M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap 2003; 16(4): 385-393.
10. Smith P, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Applied Microbiology 1998; 26:118-122.
11. Nereyda E. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai 2011; 7(1): 153-170.
12. Zink DL. The impact of consumer demands and trends on food processing. Emerg Infect Dis 1997; 3: 467-469.
13. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Front Microbiol 2012; 3: 1-24.
14. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. Int J Food Microbiol 2004; 94(3): 223-253.
15. Bassolé IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules 2012; 17(4): 3989-4006.
16. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 2000; 88(2): 308-316.
17. Rentsenkhand T. Effect of essential oils and their combinations on food-spoilage microorganisms. [Tesis]. Szeged: Univ. of Szeged; 2010.
18. Martino T, Leyva V, Puig Y, Machin M, Aportela N, Ferrer Y. *Bacillus cereus* y su implicación en la inocuidad de los alimentos. Revista Cubana de Salud Pública. 2010; 36(1)128-138.
19. Olaimat AN, Holley RA. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. Food Microbiol 2012; 32(1):1-19.
20. Arias M. Determinación de la actividad antimicrobiana de algunas especies naturales sobre microorganismos asociados a alimentos. [Tesis]. Universidad de Costa Rica; 2007.
21. Ilhami G, Mahfuz E, Hassan Y, Aboul E. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. Arabian Journal of Chemistry 2012; 5, 489-499.

22. Vokou D, Varelzidou S, Katinakis P. Effects of aromatic plants on potato storage-sprout suppression and antimicrobial activity. *Agric Ecosyst Environ* 1993; 47:223-235.
23. Hongmei L, Xianjin W, Yizeng L, Zhang J. Variation in chemical composition and antibacterial activities of essential oils from two species of *Houttuynia THUNB*. *Chem Pharm Bull* 2006; 54(7): 936-940.
24. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 88(2-3):199-204.
25. González R. Eugenol. Propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Revista Cubana Estomatología* 2002; 39:2.
26. Gupta C, Garg A, Uniyal R, Gupta S. Comparison Of Antimicrobial Activities Of Clove Oil & Its Extract On Some Food Borne Microbes Disponible en: <http://ispub.com/IJMB/7/1/13649>.
27. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essentials oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 1999; 86: 985-990.
28. Sacsquispe R, Velásquez J, Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de discos de difusión. Instituto Nacional de Salud. 2002.
29. Müller, G. Microbiología de los Alimentos Vegetales. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. 1981. 152-153.
30. Nelson J; Bednarczyk R; Nadle J; Clogher P; Gillespie J; Daniels A; Plantenga M; and et all FoodNet survey of food use and practices in long-term care facilities. *Pub. Med.* 2008; 71(2):365-72.
31. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 47: 565-573.
32. Denyer S, Hugo W. Daño inducido por Biocida a la membrana citoplasmática bacteriana. En: Denyer SP, Hugo WB, editor. Mecanismos de acción de los biocidas químicos La Society for Applied Bacteriología, Serie Técnica N ° 27. Oxford Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1991. pp 171-188.
33. Huertas J. Efecto de tratamientos térmicos en combinación con los aceites esenciales de clavo y tomillo sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes* evaluada in vitro y en una sopa comercial. [Tesis]. Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
34. Conner D. Naturally occurring compounds, Antimicrobials in foods. New York. 1993. 441-468.
35. Viuda M.; Ruiz N.; Fernández L.; Pérez A. Antifungal Activities of Thyme, Clove and Oregano Essential Oils. *J Food Safety*.2007; 27:91-101.
36. L. Nuñez, Aquino M.; Microbicide activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*). *Brazilian Journal of Microbiology*.2012; 1255-1260.