
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*

Martha I. Ardila Q.¹
Andrés F. Vargas A.¹
Jorge E. Pérez C.²
Luis F. Mejía G.³

RESUMEN

Se evaluó la actividad antibacteriana frente a *Clostridium perfringens* (cepa ATCC: 13124) por el método de Kirby Bauer en agar SPS de los aceites esenciales o extractos vegetales obtenidos con solventes orgánicos de diferente polaridad a partir de *Allium sativum* (ajo), *Coriandrum sativum* (cilantro), *Eugenia Caryophyllata* (clavo de olor), *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Thymus vulgaris* (tomillo), utilizando la vancomicina como control. Los extractos obtenidos por el método de lixiviación de *O. vulgare* y *T. vulgaris* no presentaron inhibición para este microorganismo; los demás extractos vegetales sí la presentaron, obteniéndose concentraciones bacteriostáticas mínimas que oscilaron entre 16 y 63 µl/ml. El extracto etanólico y el aceite esencial de *E. caryophyllata* fueron los que presentaron una menor concentración inhibitoria mínima (250 µl/ml). Se observan variaciones importantes en la capacidad de inhibición de dichos extractos con respecto a estudios realizados por otros grupos de investigación en el mundo, pocos de ellos utilizaron a *Clostridium perfringens*.

Palabras clave: actividad antibacterial, *Clostridium perfringens*, *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia Caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris*.

PRELIMINARY TEST OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* AND *Thymus vulgaris* EXTRACTS AGAINST *Clostridium Perfringens*.

ABSTRACT

The antibacterial activity against *Clostridium perfringens* (ATCC: 13124) of essential oils and extracts obtained from *Allium sativum* (garlic), *Coriandrum sativum* (coriander), *Eugenia Caryophyllata* (clove), *Origanum vulgare* (oregano), *Rosmarinus officinalis* (rosemary) and *Thymus*

¹ Estudiantes Programa Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad de Caldas. Manizales, Caldas (Colombia).

² Profesor del Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias para la Salud, Universidad de Caldas. Manizales, Caldas (Colombia).

³ Profesor del Departamento de Ingeniería, Facultad de Ingenierías, Universidad de Caldas. Manizales, Caldas (Colombia).

vulgaris (thyme) tested by means of the Kirby Bauer method in SPS agar, using vancomycin as the control. The extracts obtained by the lixiviation method from *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* do not show inhibition, whereas the other extracts had minimal bacteriostatical concentrations between 16 to 63 µl/ml. The *E. caryophyllata* ethanolic extract and essential oil presented a lower minimal inhibitory concentration (250 µl/ml). Important variations

in the inhibitory capacity of the extracts and essential oils were observed, regarding studies carried out by other research groups in the world, few worked with *Clostridium perfringens*.

Key words: antibacterial activity, *Clostridium perfringens*, *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia Caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris*, essential oils.

INTRODUCCIÓN

Según la organización Mundial de la Salud más del 30% de las personas en países industrializados sufren de enfermedades asociadas con los alimentos; por otro lado, esta misma organización está impulsando una política del no uso de sal como conservante de alimentos para tratar de disminuir los casos de enfermedad cardiovascular en el mundo; además, en el mundo occidental se observa una tendencia hacia el consumo de alimentos hechos con compuestos naturales y no sintéticos (26, 29).

El interés por cambiar los conservantes tradicionales como los nitritos en los productos cárnicos, ha despertado la inquietud en los procesos para la obtención de aceites esenciales y extractos vegetales de diversas plantas que posibiliten nuevas alternativas en la conservación de estos productos; en el proceso de los cárnicos el nitrito juega un papel importante como agente de curado y conservante, ya que aporta características de color y textura y como agente inhibidor de microorganismos como *Clostridium perfringens*, por lo cual se quiere generar diversos componentes que permitan reemplazarlo en todos sus aspectos ya que en muchos países, incluso de alto nivel sanitario, más de la mitad de todos los brotes epidémicos de enfermedades transmitidas por los alimentos son causados por carne y productos cárnicos que son los que más

se asocian con la tóxica infección producida por *C. perfringens*, pues ofrecen condiciones ideales para su desarrollo (1). Unas pocas bacterias pueden sobrevivir después de la cocción de los alimentos y si las condiciones ambientales lo permiten, se multiplican hasta llegar a la dosis infectante (2).

Cuando las células vegetativas de *Clostridium perfringens* llegan al intestino y esporulan, producen la enterotoxina que es la responsable del cuadro clínico, una toxico infección caracterizada por náuseas, diarrea, dolor y gases abdominales, 6 a 12 horas después de haber ingerido los alimentos contaminados (2-4).

En las décadas precedentes las plantas medicinales han ganado importancia; la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales o extractos naturales de estas, y los productos naturales han mostrado el potencial de las plantas como fuente de agentes antimicrobianos (5, 6, 25, 26).

El ajo (*Allium sativum*), del cual se realiza la extracción del disulfuro de alilo ($C_6H_{10}S_2$), trisulfuro de alilo y tetrasulfuro de alilo, tiene un efecto bactericida, acción que se ha atribuido a los componentes sulfurosos y fenólicos.

Un patrón con el que se compara el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales o cualquier otro agente bactericida es el fenol.

El coeficiente fenólico de los aceites esenciales indica el grado de actividad de las distintas sustancias, con referencia al fenol (7).

El aceite esencial del cilantro (*Coriandrum sativum*) contiene diferentes moléculas como el cineol, el borneol, el canfeno, el citronelol, el coriandrol y el geraniol, entre otros, que son importantes porque se ha demostrado sus efectos antimicrobianos, antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos y antiespasmódicos (8).

Los aceites esenciales obtenidos de especias y hierbas aromáticas tienen propiedades antimicrobianas y pueden contribuir a garantizar la inocuidad de los alimentos. El clavo de olor (*Eugenia Caryophyllata*), del cual se realiza la extracción del eugenol, en altas concentraciones tiene un efecto bactericida, acción que se ha atribuido a los fenoles por degeneración de las proteínas lo que resulta en daño a la membrana celular, a diferencia de las bajas concentraciones de eugenol que tienden a estabilizar las membranas celulares (9, 10).

El agente activo del tomillo (*Thymus vulgaris*) es el timol que se caracteriza por su poder desinfectante y fungicida. Por su sabor agradable está presente en la formulación de diversos enjuagues bucales, pastas de dientes, etc. Una disolución de 5% de timol en etanol se utiliza para la desinfección dermal y contra infecciones con hongos (11).

Resultados recientes revelan el poder desinfectante de los aceites esenciales purificados a partir de hierbas de uso tradicional. El timol y el carvacrol, aceites esenciales presentes en el orégano y el tomillo, se emplean en la industria alimenticia como antibacterianos; estos aceites han mostrado un efecto frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas (12), con resultados similares a los dados por los antibióticos (13); y al compararlos con el efecto del ácido láctico sobre *L. monocytogenes*, se ha encontrado una inhibición superior al 50% por parte de ambos aceites (14).

En el romero (*Rosmarinus officinalis*) la mayor parte de la evidencia de los usos medicinales provienen de la experiencia clínica más que de estudios científicos. Sin embargo, recientes estudios de laboratorio han mostrado que el romero disminuye el crecimiento de algunas bacterias tales como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que están relacionadas con el proceso de descomposición de los alimentos, y puede en realidad comportarse mejor que algunos de los conservantes de alimentos comercializados en la actualidad. Los principales agentes activos contenidos en el aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* son: pineno, canfeno, 1,8 cineol, limoneno, alcanfor, linalol, D-linalol, borneol y su acetato, terpeno y cariofileno. El aceite es extraído de flores, tallos, y hojas (15, 16).

En la actualidad se preparan extractos genuinos de especias y condimentos tratándolos con disolventes orgánicos; estos extractos ofrecen ventajas entre las que se encuentran las siguientes: permiten disponer de un producto homogéneo; desde el punto de vista microbiológico, los extractos ofrecen la ventaja de hallarse prácticamente libres de gérmenes; son especialmente útiles para la preparación de conservas a partir de productos muy sensibles al calor, como por ejemplo el pescado; la mezcla de extractos y sacarosa o glucosa son muy convenientes para el curado de la carne y pueden emplearse con la sal de cocina y los aceites vegetales (17).

En la presente investigación se determinó el efecto inhibitorio del crecimiento de *Clostridium perfringens*, frente a extractos obtenidos con diferentes solventes de los bulbos de *Allium sativum* (ajo); de las hojas y tallos de *Coriandrum sativum* (cilantro), *Eugenia Caryophyllata* (clavo de olor), *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Thymus vulgaris* (tomillo), con el fin de obtener métodos alternativos, que sean orgánicos para la conservación de alimentos cárnicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal

Los bulbos de *Allium sativum* y los botones de *Eugenia caryophyllata* fueron adquiridos en mercados locales de Manizales, Caldas (Colombia); tallos y hojas de *Coriandrum sativum*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* son provenientes de los cultivos de plantas medicinales del municipio de Villamaría, Caldas (Colombia).

Preparación de los extractos

Los bulbos de *Allium sativum* se limpiaron retirando impurezas, pelándolos y lavándolos con abundante agua; se retiró la piel por presión y se picó. Las hojas y tallos de *Coriandrum sativum*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* fueron lavados con suficiente agua para eliminar suciedades y contaminantes; posteriormente el *Coriandrum sativum* y *Origanum vulgare* se secaron a temperatura ambiente, se picaron y se conservaron en refrigeración y congelación respectivamente hasta su proceso de extracción. El *Thymus vulgaris* se sometió a un proceso de secado a 50°C; se separaron hojas de tallos y se utilizaron las hojas en el proceso de extracción. Las hojas y tallos de *Rosmarinus officinalis* se secaron y se pulverizaron para ser llevadas al proceso de extracción. Los botones de *Eugenia caryophyllata* se adquirieron secos, se les retiraron impurezas y se llevaron a proceso de arrastre de vapor.

Los extractos de los botones de *Eugenia caryophyllata* y de *Origanum vulgare* fueron obtenidos por el método de extracción por arrastre de vapor; el resto del material vegetal y una muestra de los botones de *Eugenia caryophyllata* fueron sometidos a un proceso de extracción por el método soxhlet con solventes de distinta polaridad como etanol (el cual sólo se utilizó para la extracción de componentes de *Eugenia caryophyllata*), y mezclas de acetona, cloroformo y diclorometano con hexano.

Para la extracción en soxhlet se repartió el material vegetal en tres partes iguales para cada mezcla de solvente; la extracción de *Thymus vulgaris* se realizó sólo con dos mezclas de solventes (acetona-hexano y cloroformo-hexano); con excepción de los extractos obtenidos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum* y *Rosmarinus officinalis*, en los cuales se trabajó con mezclas de los solventes en hexano en una proporción 50-50; en los demás extractos se utilizaron proporciones de solvente con hexano de 85-15. Los extractos obtenidos fueron sometidos a rota-evaporación para recuperar solvente y obtener el extracto limpio, este último fue secado en estufa a 40°C. Los extractos de *Coriandrum sativum* y *Rosmarinus officinalis* fueron disueltos en aceite de canola; los extractos de *Thymus vulgaris* fueron disueltos en hexano, y los demás extractos se obtuvieron líquidos para su evaluación antibacteriana preliminar. Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC), se disolvieron los extractos en aceite de canola.

Microorganismos

Se trabajó con *Clostridium perfringens* cepa ATCC: 13124 (obtenido de Microbiologics®).

Evaluación de la actividad antibacteriana

Para la determinación de la actividad antibacteriana de los diferentes extractos se utilizó el método de difusión en medio semisólido en agar *perfringens* OPSP Base (Charlau, Chemie S.A.). Brevemente, 20 ml del medio se mezclaron con 1 ml del inóculo de *Clostridium perfringens* ajustado a una concentración de 10⁸ UFC/ml determinado por la escala de McFarland; se hicieron pozos de 5 mm de diámetro y 5 mm de profundidad, en los cuales se colocaron 50 µl de los extractos disueltos en hexano o aceite de canola, también se depositó en una caja independiente como control de susceptibilidad al microorganismo, la vancomicina (30 µg/ml), diferentes concentraciones de nitrito de sodio (125 µg/ml a 40 µg/ml); los solventes

utilizados para la obtención de los extractos y el aceite de canola. Se incubó bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C por 18 a 24 horas; se observó la presencia de halos de inhibición y se midió el diámetro de los mismos, el cual se comparó con el obtenido de la vancomicina; se consideró que un determinado extracto tenía acción antibacteriana cuando produjo una inhibición igual o mayor al 50% de inhibición con respecto al antibiótico (18).

Cada extracto fue sometido como mínimo a dos ensayos; se reportan promedios de las mediciones hechas.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Este procedimiento se realizó por el método de Kirby Bauer utilizando la misma metodología descrita anteriormente (12, 19); se hicieron diluciones de los diferentes extractos y se colocaron en pozos hechos en el medio SPS; se utilizó también como control positivo la vancomicina a una concentración de 30 µg/ml; se hizo la lectura al cabo de 24 horas de incubación a 37°C; la inhibición se corroboró mediante repiques de la zona de inhibición en medio SPS en tubo, con incubación por 24 horas más; la ausencia de turbidez, de gas y de un color oscuro en el medio se consideró como ausencia de crecimiento, confirmándose de esta manera la inhibición obtenida en aquellas diluciones que así la presentaron en el ensayo inicial.

RESULTADOS

Tabla 1. Promedio de la inhibición de *Clostridium perfringens* de extractos, aceites esenciales y la vancomicina, en medio SPS y en anaerobiosis a 37°C al cabo de 24 horas.

Extractos/ solventes	Diámetro de inhibición en mm					
	Extracto en hexano- acetona	Extracto en hexano- cloroformo	Extracto en hexano- diclorometano	Arrastre de vapor	Extracto en etanol	Díametro (mm) de la Vancomicina
<i>Allium sativum</i>	10,4	14,5	19,4			
<i>Rosmarinus officinalis</i>	14,4	13,5	11,8			
<i>Coriandrum sativum</i>	0	14,4	15,2			
<i>Origanum vulgare</i>	0	0	N.R.			
<i>Thymus vulgaris</i>	0	0	N.R.			
<i>Eugenia caryiophyllata</i>				14,9	14,5	
Vancomicina (30 µg/ml)						14,5

N.R.: no realizado.

En la Tabla 1 se reportan los resultados de los ensayos preliminares de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales y extractos obtenidos. Se utilizaron 16 muestras de diferente polaridad. Se observa cómo los extractos obtenidos con la

mezcla hexano-acetona de *Coriandrum sativum*, *Tymus vulgaris*, *Oreganum vulgare* y los obtenidos con la mezcla hexano-cloroformo de *O. vulgare* y *T. vulgaris*, no presentan actividad frente a la cepa bacteriana utilizada.

Al determinar la actividad antibacteriana del aceite de canola, del hexano, del diclorometano y del etanol no se observó inhibición de la cepa utilizada, mientras que la acetona, el cloroformo y el tween 20 presentaron inhibición del microorganismo (datos no mostrados). *Allium sativum* y *Coriandrum sativum*, presentaron actividad inhibitoria en los extractos obtenidos de la mezcla hexano-diclorometano, así como también *Rosmarinus officinalis*, presentó inhibición con los extractos hexano-acetona. Todos los extractos que presentaron inhibición tuvieron unos diámetros que comparados con la vancomicina, oscilaron entre un 72 y 133% de inhibición.

Las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) y las concentraciones bacteriostáticas mínimas (MBC) de las diferentes diluciones

de los extractos vegetales que presentaron inhibición mayor del 50% en los estudios preliminares se reportan en la Tabla 2. Ocho de los 16 extractos obtenidos presentaron inhibición; dicha inhibición osciló entre 16 $\mu\text{l/ml}$ y 63 $\mu\text{l/ml}$; sin embargo, al comprobar el efecto bactericida por repiques del cultivo, se observó crecimiento bacteriano en la mayoría de las concentraciones probadas de cada uno de los extractos, en concentraciones superiores o iguales a 250 $\mu\text{l/ml}$ de extracto. A partir de los resultados obtenidos se puede afirmar entonces que la menor concentración inhibitoria mínima (MIC) se obtuvo con el aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* y el extracto etanólico del mismo a una concentración de 250 $\mu\text{l/ml}$, y que la menor concentración bacteriostática mínima (MBC) se obtuvo también con estos mismos extractos a una concentración de 16 $\mu\text{l/ml}$.

Tabla 2. Comportamiento de diferentes concentraciones de extractos y aceites esenciales frente a *Clostridium perfringens* (cepa ATCC 13124).

EXTRACTO	MBC ($\mu\text{l/ml}$)	%INHIBICIÓN FRENTE A VANCOMICINA	MIC ($\mu\text{l/ml}$)	%INHIBICIÓN FRENTE A VANCOMICINA
<i>Allium sativum</i>				
Extracto hexano-diclorometano	63	71	500	100
Extracto hexano-cloroformo	16	70	500	92
<i>Coriandrum sativum</i>				
Extracto hexano-diclorometano	63	64	N.O.	
Extracto hexano-cloroformo	63	72	1000	MAYOR DEL 100%
<i>Rosmarinus officinalis</i>				
Extracto hexano-diclorometano	63	83	1000	MAYOR DEL 100%
Extracto hexano-cloroformo	31	71	1000	MAYOR DEL 100%
Extracto hexano-acetona	31	71	1000	MAYOR DEL 100%
<i>Eugenia caryophyllata</i>				
Aceite esencial extraído por arrastre de vapor	16	100	250	89
Extracto etanólico	16	87	250	89

MIC: concentración inhibitoria mínima; MBC: concentración bacteriostática mínima; N.O: no observada (obtención de crecimiento bacteriano en cualquiera de las concentraciones probadas).

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. 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 (27, 32, 34); 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 (28). 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 (23, 24).

La mayoría de los estudios realizados utilizan aceites esenciales y microorganismos diferentes al utilizado en este estudio. La importancia en la inhibición de *Clostridium perfringens* radica en la capacidad toxigénica que tiene y en su capacidad de formación de esporas que lo pueden hacer bastante resistente a los efectos adversos que sobre el microorganismo puedan ejercer conservantes de origen natural como los obtenidos de plantas aromáticas y especias. En este aspecto algunos estudios realizados bajo anaerobiosis han demostrado la mayor capacidad de los compuestos obtenidos de plantas aromáticas para ejercer un efecto

inhibitorio en estas condiciones que bajo condiciones de aerobiosis, ya que la baja concentración de oxígeno da lugar a pocos cambios oxidativos y aumenta la susceptibilidad de los microorganismos probados; de esta manera se ha determinado que esta actividad es mayor en los aceites obtenidos del orégano, tomillo, clavo y cilantro (29).

Bajo nuestras condiciones experimentales se observa cómo los extractos hexano-cloroformo y hexano-acetona de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris*, no produjeron un efecto inhibitorio sobre *C. perfringens*; estudios realizados han demostrado cómo el aceite esencial de estas especias, ha tenido efecto sobre bacterias entéricas tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *C. perfringens* y *C. botulinum* (22, 27, 33), produciendo halos de inhibición que oscilan entre 7 a 24 mm; se han utilizado dichos aceites en el proceso de desinfección de aguas grises encontrándose efectos antimicrobianos a concentraciones de hasta 94 mg/L por 30 minutos, concentración a la cual se observó una inactivación total de coliformes totales (27); en otros estudios se ha demostrado su actividad en concentraciones de 0,2 µl/L frente a *L. monocytogenes* y *E. coli*, asociando este efecto al carvacrol y el timol (29). A partir de estos hallazgos se podría sugerir que los componentes activos de estas plantas se obtienen en mayor concentración por medio de arrastre de vapor que por extracción con los solventes utilizados; también se ha demostrado en algunos casos que los solventes orgánicos y detergentes tienen la capacidad de disminuir la concentración inhibitoria mínima de los aceites esenciales obtenidos de clavo y orégano (29), mientras que en otros se ha postulado que los solventes orgánicos tienen mayor capacidad de extracción de los componentes activos de las plantas en general (23, 24), tal como fue demostrado por Packiyasothy et al. (35), quienes encontraron mayor actividad antimicrobiana en los extractos obtenidos con hexano; este estudio muestra cómo los

extractos hexano-cloroformo y hexano-acetona no generaron ningún efecto sobre *Clostridium perfringens* en particular, lo cual podría deberse a diferentes factores como la concentración de compuestos activos, la composición de dichos extractos o su capacidad reducida en afectar el metabolismo y la capacidad de esporulación de este microorganismo; es necesario entonces realizar nuevos estudios que puedan demostrar la validez de dicha hipótesis.

El aceite esencial de *Coriandrum sativum* ha sido utilizado para tratar algunas dolencias no relacionadas con las enfermedades infecciosas; sin embargo, se ha demostrado que dicho aceite esencial tiene actividad antimicrobiana frente a diferentes géneros de bacterias Gram positivas (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas; el efecto de esta planta se ha buscado tanto en las hojas como en las semillas y en los tallos de los mismos (30-32). Un estudio reciente encontró concentraciones inhibitorias mínimas del aceite esencial de esta planta en valores que oscilaron entre 108 a 217 mg/L, con porcentajes de inhibición con respecto al cloramfenicol que variaron del 25 al 51% (30); en este estudio los extractos de hexano-cloroformo y hexano diclorometano produjeron inhibición del crecimiento de *Clostridium perfringens* a diluciones de 63 µl/ml (correspondiente a un porcentaje de inhibición del 71% frente a la vancomicina); sin embargo, la concentración inhibitoria mínima se obtuvo solamente con el extracto puro obtenido con la mezcla hexano-cloroformo; este resultado indica que los extractos probados son capaces de inhibir el crecimiento vegetativo del microorganismo, mas no su capacidad de esporulación, ni tampoco afecta la capacidad de dichas esporas para germinar cuando se colocan en un medio libre del extracto. El efecto antimicrobiano de esta planta se ha asociado con el linalool, el cual tiene la capacidad de inhibir incluso la esporulación (30); la mayor concentración del linalool se ha obtenido a partir del aceite esencial de los frutos de la planta (31, 32); a partir de los hallazgos obtenidos se podría suponer entonces que de

las hojas de esta planta (el cilantro) se obtiene mayor concentración de linalool cuando se hace la extracción con la mezcla hexano-cloroformo, hallazgo que requeriría ser corroborado con el uso de métodos cromatográficos que permitan identificar y cuantificar las moléculas obtenidas en dichos extractos.

Muchos compuestos presentes en aceites esenciales obtenidos de diferentes plantas, tales como: fenoles, flavonoides y otros polifenoles actúan contra reconocidas bacterias patógenas, mohos y levaduras presentes en alimentos (20, 33). Shan et al., determinaron en más de 10 aceites esenciales la relación existente entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad de inhibición de bacterias Gram positivas y Gram negativas; según los resultados obtenidos, el contenido de fenoles produce un efecto importante en la capacidad inhibitoria de los extractos; para el caso de *Rosmarinus officinalis* la concentración de fenoles fue más baja que la de otros aceites esenciales como por ejemplo *Eugenia caryophyllata* y *Oreganum vulgare*, razón por la cual su capacidad inhibitoria de varios microorganismos diferentes a *Clostridium perfringens* fue menor (33). En una investigación realizada por Chaibi et al. (20) se determinó la acción antibacteriana sobre la germinación de esporas y crecimiento vegetativo de *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum* por nueve aceites esenciales; todos los aceites esenciales probados fueron esporostáticos, dentro de ellos el obtenido de *Rosmarinus officinalis*; en el presente estudio se observa cómo la concentración inhibitoria mínima frente al extracto de esta planta se obtiene sin haber realizado ninguna dilución del mismo, lo cual indica que dicho extracto sí tiene la capacidad de inhibir la esporulación o la germinación de las esporas de *Clostridium perfringens*.

Eugenia caryophyllata y *Allium sativum*, presentaron MICs que oscilaron entre 250 a 500 µl/ml, siendo el aceite esencial y el extracto etanólico de *E. caryophyllata* los que presentan la menor concentración inhibitoria mínima de

todos los extractos probados. Savitri en 1986 (21), encuentra que los extractos de *Allium sativum* y *Eugenia Caryophyllata*, producen la inhibición en la formación de gas por parte de *C. perfringens* a concentraciones inferiores al 1% (10 µl/ml); esta inhibición en la producción de gas y en el cambio de color del medio de cultivo fue observada en esta investigación no sólo en las diluciones que presentaron una concentración bactericida mínima, sino también en aquellas en que se obtuvo una concentración bacteriostática mínima, siendo los extractos de *E. caryophyllata* los que presentaron una menor MBC; por lo tanto, los resultados obtenidos por nosotros con los compuestos obtenidos de ambas plantas en cuanto a la concentración bacteriostática mínima, son similares a los reportados por Savitri. Es posible entonces suponer que por la capacidad de generación de esporas de resistencia, este microorganismo puede escapar al efecto bactericida de dichos extractos, permitiendo su germinación cuando las condiciones de cultivo cambian.

Se ha observado cómo hay variación en la concentración y composición de los aceites esenciales obtenidos de una misma planta; estas variaciones se pueden deber a diferentes factores como las condiciones agronómicas del suelo, las

malezas presentes que compiten por nutrientes con la planta, el momento en el que se cosechan los componentes de la misma, las partes usadas para la extracción y el tipo de fertilización utilizada (29, 31, 32); la capacidad inhibitoria de los aceites y extractos utilizados en este estudio varía con respecto a lo observado en otras investigaciones, es posible que estas variaciones se deban a los factores antes mencionados, razón por la cual es necesario hacer estudios que así lo demuestren.

Son promisorios los efectos observados en los extractos y aceites esenciales obtenidos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Rosmarinus officinalis* y *Eugenia caryophyllata* en este estudio, su utilización en productos alimenticios va a depender de su capacidad de inhibición del crecimiento y de la esporulación de *Clostridium perfringens* en los alimentos, los cuales pueden tener factores que pueden interferir en la acción antimicrobiana de estos extractos (27), razón por la cual es necesario hacer estudios que demuestren la efectividad, inocuidad y poca capacidad de modificación de las condiciones organolépticas de los alimentos para poder establecer estos extractos como alternativas viables de conservación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hatakka , M. Microbiological quality of hot meals served by airlines. J Food Prot 1998;61:1052-1056.
2. Meer, R.R; Songer, J.G; Park, D.L. Human disease associated with *Clostridium perfringens* enterotoxin Rev Environ Contam Toxicol 1997;150:75-94.
3. Hatheway, C.L. Toxigenic Clostridia. Clin Microbiol Rev 1990;3:66-98.
4. Rodríguez, E; Gamboa, M.M; Vargas, P. *Clostridium perfringens* en carnes crudas y cocidas y su relación con el ambiente en Costa Rica. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 2002. 52: 155-159
5. Marín O, A.M; López Z, C.A; Pérez C, J.E; Isaza M, G. Actividad antifúngica de los extractos acuosos de *Baccharis trinervis*, *Baccharis latifolia* y *Solanum dolichosepalum*. Biosalud 2006;5:51-59.
6. Loeffler, J; Stevens, D.A. Antifungal drug resistance. Clin infect dis 2003;6:31-41.
7. Martínez C, V. Cilantro (*Coriandrum sativum*) [Internet]; 2007. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/medicinals/cilantro.Coriandrumsativum.htm>. Consultado Mayo 22 de 2007.
8. Euroresidentes. Romero (*Rosmarinus officinalis*) [Internet]; 2007. Disponible en: <http://www.euroresidentes.com/Alimentos/hierbas/romero.htm>. Consultado Abril 12 de 2007.
9. Markowitz, K ; Moynihan, M.L. ; Kim S, K. Biologic properties of Eugenol and Zinc oxide-eugenol. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1992;73:29-39.
10. González E, R. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. Rev. Cubana Estomatol 2002;39:139-156.
11. López L, M., Tomillo propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. Rev Of Farm 2006;25:74-77.
12. Albado P, E; Sáez F, G y Ataucusi S, G. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Rev Med Hered 2001;12:16-19.
13. Hersch-M, P, Leaños-M, B.E, Solórzano-S., F. Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. Fitoterapia 2005;76:453- 457.
14. Dimitrijevic, S.I; Mihajlovski, K.R; Antonovic, D .G; Milanovic-S, M.R; Mijin, D.Z. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L, *Rosmarinus officinalis* L and *Origanum vulgare* L. Food Chemistry, 2007.104:774-782.
15. Euroresidentes. Romero (*Rosmarinus officinalis*) [Internet]; 2007. Disponible en: <http://www.euroresidentes.com/Alimentos/hierbas/hierbas.htm>. Consultado Abril 12 de 2007.
16. Natura. Aceite Orgánico de Romero [Internet]; 2007. Disponible en: http://fuentenatura.com/rosmarinus_officinalis.html. Consultado Mayo 22 de 2007.
17. Carnilac. Métodos para la desinfección de los conservadores más antiguos: Especies y condimentos [Internet]. 2006 Disponible en: <http://www.alfa-editores.com/carnilac/Dic2005 Enero2006/ACTUALIDADESMetodos.pdf>. Consultado abril 12 del 2007
18. Pascual, M.E; Slowing, K; Carretero, E; Sánchez M, D; Villar, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. J. Ethnopharmacol 2001;76:201-214.

19. Milos, M; Mastelic, J; Jerkovic, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. hirtum). Food Chem 2000;71:79-83.
20. Chaibi, A. Inhibition of Germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *C. botulinum* 62A spores by essentials oils. Food Chemistry 1997;14:161-164.
21. Savitri, A. Effect of spices on in Vitro gas production by *C. Perfringens*. Food microbiology 1986;3:195-199.
22. Nevas, M. Antibacterial efficiency of finnish Spice Essentials oils against pathogenic and spoilage bacteria. Journal of Food protection 2004;67:199-202.
23. Baratta, M. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. Journal of Essential oils research 1998;16:618-627.
24. Ultee, A. Bactericidal activity of carvacol towards the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. Journal of applied microbiology 1998;85:211-218.
25. Packiyasothy, E.V and Kyle, S. Antimicrobial properties of some herb essentials oil. Food Australia 2002;54:384-387.
26. Singh, G. Antioxidative and Antibacterial potentials of essentials oils and extracts isolate from various spices materials. Journal of Food safety 2005;25:130-145.
27. Winward, GP; Avery, L.M; Stephenson, T; Jefferson, B. Essential oils for disinfection of grey water. Water research 2008;42:2260-2268.
28. Bakkali, F; Averbeck, S; Averbeck, D; Idaomar, M. Biological effects of essential oils. Food and chemical toxicology 2008;46:446-475.
29. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology 2004;94:223-253.
30. Matasyoh, J.C; Maiyo, Z.C.; Ngure, R.M; Chepkorir, R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Coriandrim sativum*. Food Chemistry 2009;113:526-529.
31. Burdock, G.A; Garabin, I.G. Safety of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil as food ingredient. Food and Chemical Toxicology 2009;47:22-34.
32. Delaquis, P.J; Stanich, K; Girard, B; Mazza, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology 2002;74:101-109.
33. Shan, B; Zhong C, Y; Brooks, J.D; Corke, H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. International Journal of Food Microbiology 2007;117:112-119.
34. Benkeblia, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) Lebensm.-Wiss. U.-Technol 2004;37:263-268.
35. Packiyasothy, E.V; Kyle, S. Antimicrobial properties of some herb essential oils. Food Australia 2002;54:384-387.