

## EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ENELDO –*Anethum graveolens*– COMO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus*, COLIFORMES Y HONGOS PRESENTES EN LA CARNE DE TRUCHA

D. V. Castro<sup>\*1</sup>, A. Pantoja<sup>1</sup>, H. A. Gomajoa<sup>2</sup>

Artículo recibido: 26 de agosto de 2016 • Aprobado: 12 de octubre de 2017

### RESUMEN

El aceite esencial de eneldo tiene propiedades antimicrobianas y antifúngicas, por lo que puede ser utilizado para evitar el deterioro de los alimentos. En esta investigación se evaluó la capacidad inhibitoria del aceite esencial de eneldo sobre *Staphylococcus aureus*, coliformes y hongos presentes en la carne de trucha (*Oncorhynchus mykiss*), utilizando 50 y 100 µL de aceite esencial. Se evaluaron diferentes condiciones de extracción del aceite esencial mediante el método de hidrodestilación y se logró un rendimiento máximo en base seca de 1,32% utilizando una relación 1:5 de agua y material vegetal durante 90 minutos. Al evaluar la capacidad antimicrobiana, el mayor efecto inhibitorio se obtuvo al aplicar 100 µL de aceite esencial de eneldo en cultivos de *Staphylococcus aureus*, coliformes fecales, coliformes totales y hongos, evidenciándose un mayor halo de inhibición para coliformes totales.

**Palabras clave:** actividad antimicrobiana, aceite esencial de eneldo, carne de trucha.

## *IN VITRO* EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL CAPACITY OF THE ESSENTIAL OIL OF DILL –*Anethum graveolens*– AS A GROWTH INHIBITOR OF *Staphylococcus aureus*, COLIFORMS AND FUNGI FOUND IN TROUT MEAT

### ABSTRACT

Dill essential oil has antimicrobial and antifungal properties; therefore it can be used in food to avoid deterioration. In this research, the inhibitory capacity of dill essential oil on *Staphylococcus aureus*, coliforms and fungi present in trout meat (*Oncorhynchus mykiss*) was evaluated by using 50 and 100 µL of essential oil. In addition, the different conditions of essential oil extraction were evaluated by the hydrodistillation method, yielding a maximum dry basis yield of 1.32%, using a water-plant ratio of 1:5, during 90 minutes. Antimicrobial capacity was evaluated obtaining greater inhibitory effect when applying 100 µL of dill essential oil in cultures of *Staphylococcus aureus*, fecal coliforms, total coliforms and fungi, evidencing a greater halo of inhibition for total coliforms.

**Key words:** Antimicrobial activity, dill essential oil, trout meat.

<sup>1</sup> Estudiantes de Ingeniería de Procesos, Facultad de Ingeniería, Universidad Mariana, Calle 18 No. 34 - 104, Pasto (Nariño, Colombia).

<sup>2</sup> Ingeniero Agroindustrial, candidato a Magister en Ciencias Agrarias; docente investigador, Facultad de Ingeniería de Procesos, Universidad Mariana.

\* Autor para correspondencia: hgomajoa@umariana.edu.co

## INTRODUCCIÓN

El pescado y los productos pesqueros representan una valiosa fuente de proteínas y micronutrientes esenciales para conseguir una nutrición balanceada y una buena salud (Reverter *et al.* 2014). Con el propósito de garantizar la disponibilidad de nutrientes se emplean diversos métodos de conservación que buscan, entre otros efectos, controlar la oxidación de los lípidos e inhibir el desarrollo de bacterias patógenas en los alimentos. La adición de antioxidantes naturales y compuestos con actividad antimicrobiana, tales como aceites esenciales, extractos de plantas o bactericidas vienen remplazando aquellas sustancias químicas que se utilizaban para tal fin (Smaoui *et al.* 2016).

De acuerdo con diversos estudios el eneldo (*Anethum graveolens*) tiene actividad antimicrobiana, anti fúngica y antioxidante; también se ha demostrado que el aceite esencial puede ser usado ampliamente en la industria alimentaria a fin de evitar el deterioro de alimentos (Tayarani *et al.* 2016).

Se puede obtener aceite esencial por medio de varios métodos (Peredo-Luna *et al.* 2009). En la presente investigación se utilizó la hidrodestilación a escala de laboratorio, método de destilación consiste en evaporar una suspensión acuosa del material vegetal; durante toda la operación este se encuentra sumergido en agua y en constante agitación para evitar la aglomeración o la sedimentación que pueden degradar térmicamente el aceite esencial (Arjimijo 2012); a nivel de planta piloto, por medio de la inyección de vapor, se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente más volátil de la mezcla (Peredo-Luna *et al.* 2009).

Con la presente investigación se pretende evaluar la capacidad antimicrobiana

y antifúngica del aceite esencial de eneldo (*Anethum graveolens*) usándolo como inhibidor del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, coliformes y hongos en la carne de trucha.

## MATERIALES Y METODOS

### Recolección de materia prima

Se recolectaron 10 kg de eneldo en varias fincas del corregimiento de Genoy (municipio de Pasto, Nariño, Colombia). La materia prima se depositó en bolsas plásticas que se transportaron a los laboratorios del campus Alvernia de la Universidad Mariana de la ciudad de Pasto para su análisis, almacenándose a temperatura ambiente ( $15\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) durante 24 horas. La materia prima cárnica se obtuvo de un establecimiento comercial en una cantidad de 1 kg y se refrigeró a  $4^{\circ}\text{C}$  durante nueve días.

### Acondicionamiento de la materia prima

El material vegetal se secó mediante exposición al sol durante cuatro horas hasta alcanzar una humedad cercana al 38%; posteriormente se llevó a la planta de operaciones industriales de la sede Alvernia de la Universidad Mariana.

### Determinación de las condiciones de extracción

Para el establecimiento de las condiciones de extracción del aceite esencial de eneldo, mediante destilación simple en el laboratorio de química de la Universidad Mariana de Pasto, se probaron dos proporciones de agua : materia prima (1:5 y 1:6) y dos variantes de tiempo de extracción (60 y 90 min), a una temperatura de  $92^{\circ}\text{C}$ , que es la temperatura de ebullición del

agua a una presión atmosférica de 14,8 PSI registrada en la ciudad de Pasto.

Las pruebas se hicieron por duplicado; el aceite del producto destilado se obtuvo por medio de separación de fases con ayuda de un embudo de decantación. Se seleccionó la muestra que obtuvo el mayor rendimiento. El resultado obtenido se llevó a escala piloto, haciendo la extracción de 4 kg de eneldo mediante la técnica de arrastre con vapor en un extractor multipropósito a una presión de 1,5 PSI y una temperatura de 92°C, durante 90 minutos.

### Procedimiento del análisis microbiológico

Mediante la metodología de recuento en placa se cuantificaron las UFC/ml de *Staphylococcus aureus*, coliformes fecales, coliformes totales y hongos presentes en la superficie de una muestra de carne fresca de trucha y otra muestra de carne con un recubrimiento de aceite esencial de eneldo a las concentraciones de 50  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$ , utilizando una dilución de  $10^{-3}$  de la muestra (10 g) en agua peptonada. Como medios de cultivo para los microorganismos se utilizaron agar Baird-Parker y agar Chromocult. El conteo de los microorganismos se realizó a los días 0, 5 y 10. Cada una de las muestras se realizó por triplicado. Se descartaron las cajas Petri que contenían más de 300 UFC/ml.

### Valoración de actividad antimicrobiana

Se tomó una muestra de las cajas Petri con coliformes totales, coliformes fecales, hongos y *Staphylococcus aureus*; se diluyeron las muestras en agua peptonada y se inocularon las muestras en cajas Petri utilizando como medio de cultivo agar nutritivo. A continuación, se depositaron

en las cajas Petri los discos de papel de filtro impregnados de aceite esencial a dos diferentes concentraciones, 50  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$ , un disco con agua peptonada a manera de blanco y un disco de cloranfenicol de 30  $\mu\text{g}$ ; posteriormente se midió con una regla el diámetro de los halos de inhibición que formaron cada uno de los discos y se seleccionaron las muestras en las que se formó halo de inhibición. De acuerdo con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para probar si existen diferencias significativas en la valoración del efecto antimicrobiano del aceite. Se analizó la significancia de cada variable teniendo en cuenta que P-valor sea menor que 0,05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación de las condiciones de extracción

El rendimiento máximo de aceite esencial obtenido por hidrodestilación fue de 1,32%, a una relación de 1:5 (agua destilada : eneldo), durante un tiempo de destilación de 90 minutos, como se muestra en la Tabla 1. De acuerdo con los resultados del análisis estadístico, que se muestra en la Tabla 2, el rendimiento del aceite esencial depende del tiempo de extracción ( $P < 0,05$ ), la relación de agua: materia prima no es una variable significativa, como tampoco lo es la relación de agua : materia prima con respecto al tiempo.

Al realizar la extracción, a escala de planta piloto, se obtuvo un rendimiento de 0,087%; los rendimientos obtenidos en las diferentes extracciones están por debajo de los encontrados en otras inves-

tigaciones. Cano *et al.* (2002) reportan rendimientos entre 2,5 y 4% logrados por arrastre de vapor y las diferencias se atribuyen a factores como la humedad del material vegetal, el cual debería estar entre 25 y 30% según Moreno *et al.*

(2010), mientras que la humedad de la muestra vegetal de eneldo utilizado en la presente investigación fue de 53% lograda mediante secado de forma natural con una humedad relativa mayor, por lo que no se pudo alcanzar la humedad deseada.

**TABLA 1.** Rendimiento del aceite esencial de eneldo por medio de destilación simple.

Relación agua: materia prima (mL/g)	Tiempo (minutos)	Rendimiento (%)
1:6	60	0,95
1:6	90	1,05
1:5	60	1,20
1:5	90	1,32

**TABLA 2.** Análisis estadístico sobre el rendimiento del aceite esencial obtenido.

Fuente	P-valor
A: relación agua : materia prima	0,1153
B: tiempo	<b>0,0175</b>
AB	0,1415
BB	0,5967

**TABLA 3.** Conteo de microorganismos presentes en la carne de trucha.

Tipo de microorganismos	UFC/ml					
	Sin recubrimiento			Con recubrimiento		
	Tiempo (días)					
	0	5	10	0	5	10
Coliformes totales	>300	>300	>300	– *	>300	>300
Coliformes fecales	2	>300	>300	–	>300	>300
<i>Staphylococcus aureus</i>	>300	34	0	–	0	0
Hongos	0	>100	>300	–	>300	>300

\* El día cero con recubrimiento corresponde al conteo inicial.

## Análisis microbiológico

Según el Acuerdo Nacional Piscícola la producción nacional de peces de cultivo concierne, principalmente, a las especies de tilapia, trucha y cachama, cuya participación conjunta, durante los últimos 12 años, ha sido del 96,3% del total de la piscicultura y del 65,3% de la producción acuícola; en Nariño se cria el 13% de peces en el país.

Las UFC/ml fueron mayores a 300 en un cultivo con una dilución de  $10^{-3}$ , teniendo en cuenta la muestra tomada de la carne se observó incremento de la concentración de microorganismos en el agua peptonada, determinándose que hubo mayor crecimiento de estos en las cajas Petri. El conteo de microorganismos se muestra en la Tabla 3.

En el quinto día se observó una notable reducción del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, sin embargo, hubo presencia de hongos, debido a las condiciones de almacenamiento de la trucha en refrigeración (4°C), lo que ocasionó la inhibición de *Staphylococcus aureus*, dado que necesita una temperatura entre 40 y 45°C para su desarrollo. (Restrepo *et al.* 2001) La aparición de hongos pudo darse de manera endógena o exógena, ante o post-mortem (Restrepo *et al.* 2001), lo que genera posibles riesgos al consumidor como enfermedades gastrointestinales, intoxicación e incluso la muerte (Puig *et al.* 2011).

Las condiciones que favorecen la proliferación microbiana en la carne y los productos cárnicos son la actividad de agua (Aw), el potencial de óxido-reducción (Eh), el pH, las necesidades nutritivas y la temperatura. Cuando se presenta alguno de los factores de riesgo y los productos se contaminan, comienzan a jugar un papel importante las condiciones y características

de la carne y se estimula el crecimiento y multiplicación de los microorganismos infectantes.

## Valoración de la capacidad antimicrobiana

El aceite esencial de eneldo puede ser utilizado como recubrimiento, debido a que actúa como una película que envuelve al alimento, la cual puede ser consumida como parte del mismo (Pastor *et al.* 2005); su función es mantener la calidad de los productos recubiertos retrasando las principales causas de alteración a través de diferentes mecanismos (Debeaufort 1998; Kester y Fennema 1986).

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de eneldo se evaluó teniendo en cuenta el halo de inhibición desarrollado: los resultados se muestran en la Tabla 4. Las muestras tratadas con 50  $\mu$ L de aceite esencial de eneldo mostraron mayor capacidad antimicrobiana sobre los coliformes fecales con respecto a *S. aureus*, coliformes totales y hongos; por su parte, las muestras tratadas con 100  $\mu$ L aceite esencial de eneldo mostraron mayor capacidad antimicrobiana en coliformes totales con respecto a *S. aureus*, coliformes fecales y hongos. El patrón presentó mayor capacidad antimicrobiana sobre los coliformes totales con respecto a los demás microorganismos evaluados; sin embargo, también exhibió actividad antimicrobiana sobre coliformes fecales y *S. aureus*, y adicionalmente, también presentó actividad antifúngica.

El cloranfenicol se utilizó como testigo; su alta inhibición se debe a que penetra por difusión al interior de la bacteria donde se une a la fracción 50S (unidad de velocidad de sedimentación) del ribosoma impidiendo la transpeptidación entre los aminoácidos de la cadena peptídica, con lo

**TABLA 4.** Resultados derivados del halo de inhibición.

Tipo de microorganismos	Halo de inhibición (mm)			
	Aceite esencial (50 µL)	Cloranfenicol (30 µg)	Aceite esencial (100 µL)	Cloranfenicol (30 µg)
Coliformes totales	0,87	3,43	1,33	3,60
Coliformes fecales	1,03	2,30	1,03	2,80
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,77	3,27	0,96	3,13
Hongos	0,60	1,43	0,76	1,90

**TABLA 5.** Análisis estadístico del efecto antimicrobiano.

Fuente	P-valor
A: Cantidad de aceite	0,2787
B: Microorganismos	0,0041
AB	0,2208
BB	0,5553

que impide la elongación de la cadena en crecimiento. El mecanismo de resistencia más importante es extracromosómico, y se debe a un plásmido adquirido por conjugación que transmite la capacidad para acetilar el antibiótico (UAM 2012).

El aceite esencial mostró la capacidad de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, coliformes y hongos, observándose que a mayor volumen se presenta un mayor halo de inhibición, esto debido a que una mayor cantidad de aceite puede difundirse en una área mayor sobre la superficie del agar (Sánchez *et al.* 2007).

Estudios anteriores han demostrado que el aceite esencial de eneldo contiene carvona, limoneno, dihidrocarvona, carvacrol, *p*-cymen,  $\alpha$ -felandreno y apiol, los cuales son sustancias con actividad antimicrobiana (Di Pascua *et al.* 2006). Se sugiere que la actividad individual de estos componentes está directamente relaciona-

da con el efecto inhibitorio que presenta este estudio. En efecto, la actividad antibacteriana del aceite esencial posiblemente se deriva de sus componentes principales, como el carvacrol, componente que permeabiliza la membrana celular, además de ser capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gramnegativas (Demo *et al.* 2005). En general, los aceites esenciales son un poco más activos frente a las bacterias Grampositivas que ante las bacterias Gramnegativas (Gandhi y Chikindas 2007); sin embargo, no todas las investigaciones sobre los aceites esenciales han llegado a la conclusión de que los microorganismos Gram-positivos son más susceptibles.

El análisis estadístico, por medio de tabla ANOVA, para evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial sobre cada una de las cepas de microorganismos y hongos, con un valor de significancia P

menor a 0,05, se muestra en la Tabla 5. Así, el halo de inhibición depende del microorganismo que se esté evaluando ( $P < 0,05$ ) y la cantidad de aceite no es una variable significativa, como tampoco lo es la relación de la cantidad de aceite esencial con el tipo de microorganismo.

## CONCLUSIONES

El aceite esencial de eneldo *Anethum graveolens* presenta actividad antimicrobiana y antifúngica sobre las cepas bacterianas típicas de enfermedades de transmisión alimentaria, tales como *Staphylococcus aureus*, coliformes totales, coliformes fecales y hongos.

El aceite de eneldo, aplicado en concentraciones de 100  $\mu$ L como recubrimiento, permitió determinar que este puede ser un método efectivo de conservación de la carne de trucha, evitando pérdida de la carne por descomposición.

## REFERENCIAS

- Armijo J, Vicuña E, Romero P, Condorhuamán C, Hilario B. 2012. Modelamiento y simulación del proceso de extracción de aceites esenciales mediante la destilación por arrastre con vapor. *Rev Per Quím Ing Quím.* 15(2): 19-27.
- Cano TM, Saravia JM, Aguilar B, Cifuentes R, Chávez BL, Hernández M. 2002. Obtención y caracterización de aceite esencial de 4 plantas medicinales cultivadas a diferentes niveles de altitudes de Guatemala. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala / Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología–Senacyt.
- Debeaufort F, Quezada-Gallo JA, Volley A. 1998. Edible films and coating: tomorrow's packagings: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 38(4): 229-313. Doi: 10.1080/10408699891274219.
- Demo MS, Oliva Ma de las M, López ML, Zunino MP, Zygodlo JA. 2005. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. *Pharm Biol.* 43(2): 129-134. Doi: 10.1080/13880200590919438.
- Di Pascua R, Hoskins N, Betts G, Mauriello G. 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J Agr Food Chem.* 54(7): 2745- 2749. Doi: 10.1021/jf0527221.
- Gandhi M, Chikindas M. 2007. Listeria: A food-borne pathogen that know how to survive. *Int J Food Microbiol.* 113(1): 1-15. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008.
- Kester JJ, Fennema OR. 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technology.* 40(12): 47-59.
- Moreno J, López G, Jara RS. 2010. Modelación y optimización del proceso de extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). *Scientia Agropecuaria.* 1(2): 147-154.
- Pastor C, González-Martínez C, Vargas M. 2005. Recubrimientos comestibles: aplicación a frutas y hortalizas. *Alimentación, Equipos y Tecnología.* 24(197): 130-137.
- Puig YP, Espino M, Leiva V. 2011. Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panorama Cuba y Salud.* 6(1): 30-38.
- Peredo-Luna H, Palou-García E, López-Malo A. 2009. Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* 3(1): 24-32.
- Restrepo DA, Arango CM, Amézquita A, Restrepo R. 2001. Industria de carnes [Internet]. Medellín (CO): Universidad Nacional de Colombia; [citado 2016 abr. 23]. Disponible en: <https://decarnes.wikispaces.com/file/view/Libro+de+carnes.pdf>.
- Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal P. 2014. Use of the plants extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture.* 433(13): 50-61. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.048.
- Sánchez C, Bedoya J, Acosta E. 2007. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Aloysia triphylla* sobre cepas de *S. aureus* y *B. cereus*,

- E. coli*, *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. Scielo, 2, 5.
- Smaoui D, Hsouna B, Lahmar A, Ennouri K, Mtibaa-Chakchouk A, Sellem A, Najah S, Bouaziz M, Mellouli L. 2016. Bio-preservative effect of the essential oil of the endemic *Mentha piperita* used alone and in combination with BacTN635 in stored minced beef meat. Meat Sci. 117(July): 196-204. Doi: 10.1016/j.meatsci.2016.03.006.
- Tayarani Z, Hassanzadeh M, Nasery M, Emami A. 2016. Dill (*Anethum graveolens* L.) oils. En: Preedy V, editor. Essential oils in food preservation, flavor and safety. 1° ed. Londres (UK): Academic Press Elsevier. p. 405-412.
- [UAM] Universidad Autónoma de Madrid. 2012. Tetraciclinas, cloranfenicol y antibióticos polipeptídicos [Internet]. Curso de Farmacología. 3er Curso (Guión n° 45). Madrid (ES): Departamento de Farmacología y Terapéutica Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid; [citado 2016 abr. 23]. Disponible en: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/a55-tetraciclinas\\_cloranfenicol\\_y\\_antibioticos\\_polipeptoc.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/a55-tetraciclinas_cloranfenicol_y_antibioticos_polipeptoc.pdf).

### Article citation:

Castro DV, Pantoja A, Gomajoa HA. 2017. Evaluación *in vitro* de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de eneldo –*Anethum graveolens*– como inhibidor del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, coliformes y hongos presentes en la carne de trucha. [*In vitro* evaluation of the antimicrobial capacity of the essential oil of dill –*Anethum graveolens*– as a growth inhibitor of *Staphylococcus aureus*, coliforms and fungi found in trout meat]. Rev Med Vet Zoot. 64(2): 44-51. Doi: 10.15446/rfmvz.v64n2.67212.