

Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las hojas de *Laurus nobilis* y *Thymus vulgaris*

Sonia, Rodas-Espinoza^{1*}; Paúl, Ricaurte-Ortiz¹; Ana Hortencia, Mejía-López¹

Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano de las hojas deshidratadas de *Laurus nobilis* (laurel) y *Thymus vulgaris* (tomillo), como conservantes naturales, para ser implementado en la reducción de la carga microbiana de alimentos de alto consumo, como los quesos frescos artesanales, entre otros alimentos. Las hojas frescas de laurel y tomillo fueron recolectadas al azar, debidamente procesadas, desinfectadas, secadas por arrastre de vapor a 45°C por 14 horas y fraccionadas en un mortero para la obtención de un extracto crudo en polvo. La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se llevó a cabo a partir de la preparación de varias concentraciones del extracto crudo, en polvo, de las plantas en estudio, a través de la técnica de difusión en agar. Éstas se probaron frente a la cepa *Staphylococcus aureus* mediante la colocación de discos de papel filtro impregnado de las soluciones antimicrobianas en una caja petri con agar y con inóculo bacteriano estriado en la superficie. Se pudo concluir que a concentraciones 175 y 200 mg/ml de laurel y 125, 175 y 200 mg/ml de tomillo, había presencia de un halo inhibitorio, lo cual constituye una fuente prometedora de extractos antimicrobianos, para el control de *Staphylococcus aureus*, contaminante frecuente de los alimentos.

Palabras Clave: actividad antibacteriana; conservación de alimento; *Staphylococcus aureus*.

Evaluation of the antimicrobial capacity of the leaves of *Laurus nobilis* and *Thymus vulgaris*

Abstract

The objective of this research was to evaluate the antimicrobial effect of dehydrated leaves of *Laurus nobilis* (laurel) and *Thymus vulgaris* (thyme), as natural preservatives, to be implemented in reducing the microbial load of high consumption foods, such as the case of artisanal fresh cheese, among other foods. The fresh leaves of laurel and thyme were collected at random, duly processed, disinfected, steam-dried at 45 ° C for 14 hours and crushed in a mortar to obtain a crude powder extract. The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) was carried out from the preparation of several concentrations of the crude powder extract, through the diffusion technique in agar. These were tested against *Staphylococcus aureus* strain by the placement of filter paper disks impregnated with the antimicrobial solutions in a Petri dish with agar and bacterial inoculum on the surface. It was concluded that at concentrations of 175 and 200 mg /ml of laurel and 125, 175 and 200 mg /ml of thyme there was an inhibitory zone, which is a promising source of antimicrobial extracts for the control of *S. aureus*, a frequent food contaminant.

Keywords: antibacterial activity; food preservation; *Staphylococcus aureus*.

Recibido: 30 de enero de 2017

Aceptado: 30 de junio de 2017

¹Docente de la Universidad Nacional de Chimborazo. srodas@unach.edu.ec; pricaurte@unach.edu.ec; anamejia@unach.edu.ec orcid.org/0000-0001-6067-0346

*Autor para la correspondencia: srodas@unach.edu.ec; pricaurte

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos suponen una importante carga para la salud, millones de personas mueren por el consumo de alimentos contaminados (Alerte et al, 2012). La utilización de extractos de plantas en la inhibición de microorganismos patógenos o deteriorativos de los alimentos, en los últimos años ha despertado gran interés en la comunidad científica, para desarrollar su implementación en la industria, como es el caso de los productos lácteos. Según Generoso et al, 2010 las hierbas y especias fueron usadas para realzar el flavor de los alimentos(Khalid, 2014), sin embargo, actualmente se conoce que presentan además beneficios antioxidantes y capacidades antimicrobianas (Azuerro et al, 2016).

La producción de derivados lácteos es uno de los sectores más influyentes en la generación de empleo agrícola y en la economía ecuatoriana, especialmente en la zona interandina. El consumo de queso fresco es muy dinámico, además, constituye una fuente importante de proteínas, grasas, vitaminas y minerales. De acuerdo con las investigaciones publicadas en la revista Pulso Ecuador (2010), 92.8% de los hogares urbanos de las principales 15 ciudades consumen regularmente este producto.

Según el INEC (2012) solo el 5 % de producción de leche nacional es para el queso industrializado, mientras que el 25 % es para la producción artesanal.

En los estudios realizados en 2007 y 2008 por el Centro de Transferencia de Tecnología e Investigación Agroindustrial (CETTIA) de la Universidad Técnica Particular de Loja, se analizaron 42 muestras de queso, dando como resultado que 83.3% de las muestras estuvieron contaminadas con *E. coli*, en el segundo estudio se analizaron 120 muestras, de las cuales el 65.8% presentó contaminación por *Staphylococcus aureus*.

Los productos lácteos en general y especialmente los quesos frescos artesanales, están asociados con brotes de intoxicaciones alimentarias por una inadecuada pasteurización y deficiencias en su manipulación, en los distintos eslabones de la cadena de producción, cabe destacar que es el *S. aureus* es uno de los principales patógeno y microorganismo deteriorativos en los alimentos. (Le Loir et al, 2003; Tarekne et al, 2015).

Las enfermedades generadas por alimentos contaminados son de considerable importancia, por tal razón, la industria de alimentos implementa el uso de sustancias químicas (benzoatos, Sorbato, nitratos hipoclorito de sodio, entre otros) o bioquímicas como

las bactericinas y la Natamicina, para reducir o inhibir la presencia de microorganismos patógenos y deteriorativos de los alimentos (Beristain et al. 2012, Ollé et al, 2014).

Sin embargo, según Somasundram et al (2016), existe una tendencia mundial tanto en los países desarrollados como en los países, en vías de desarrollo, hacia el consumo de alimentos orgánicos, más naturales o con menor presencia de aditivos químicos. En tal sentido el uso de extractos de plantas con capacidad de inhibir daños microbianos en los alimentos cada vez es mayor, debido a que una gran parte de los consumidores consideran un riesgo para su salud el uso indiscriminado de conservantes o aditivos químicos, usados normalmente en la producción de alimentos (Sharma, 2015).

En tal caso, Millezi et al. (2012), Ouibrahim et al (2013) y Morales (2015), estudiaron las propiedades antibacterianas que poseen los aceites esenciales de laurel y tomillo. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del laurel y el tomillo en varias concentraciones, en el control de microorganismos patógenos o deteriorativos de los alimentos, específicamente *S. aureus*, con vistas a su posible uso como conservante de alimentos.

II. DESARROLLO

1. Metodología

Obtención de las muestras: los ejemplares de las especies vegetales *Laurus nobilis* (laurel) y *Thymus vulgaris* (tomillo) fueron recolectados del Mercado Mayorista de la ciudad de Riobamba (Provincia de Chimborazo), Ecuador; siendo procesados en el laboratorio, sin almacenamiento previo.

Tratamiento de las muestras: de cada planta se utilizaron sólo las hojas, éstas se lavaron con agua corriente, agua potable y por último hipoclorito de sodio al 2%, fueron escurridas y reposadas en papel de empaque para absorber el exceso de agua. Para el proceso de secado se esterilizó el equipo y las bandejas, se llevaron las hojas de laurel y tomillo al equipo de deshidratación (MEMMERT; Germani) a una temperatura de 45 °C por 14 horas. Los materiales deshidratados fueron triturados en un mortero y se colocaron recipientes estériles, cada uno por separado.

Cepa bacteriana: la cepa utilizada fue *Staphylococcus aureus*, perteneciente a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC 25923) y donada por el INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias). La cepa bacteriana fue reanimada en

medio Baird Parker (BP) e Incubar a 35 °C durante 24 horas.

Actividad antimicrobiana: para la determinación de la actividad antibacteriana se aplicó la técnica de difusión en agar, según el método de Kirby-Bauer descrito por Baur *et al.* (1966) y Pierce y Dennis (2010).

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para la cepa *S. aureus*, a partir de la dilución de varias concentraciones de laurel y tomillo en agua destilada estéril, en concentraciones de 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 mg/ml, respectivamente a 45°C por 20 horas. Se impregnó discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 3 mm de diámetro con 10 µl, de una solución preparada (equivalente a las concentraciones antes mencionadas) de los extractos a analizar.

Se tomó una asa bacteriológica con la cual se obtuvo una muestra de *S. aureus* y se suspendió en un tubo de ensayo con 5 ml de suero fisiológico estéril, hasta alcanzar una turbidez similar a la descrita por la metodología de comparación con un estándar de turbidez 0,5 McFarland. La suspensión bacteriana fue incorporada al medio de cultivo, mediante método de estriación con un hisopo estéril, con el cual se cubrió toda la superficie del medio.

Los discos impregnados con las diferentes concentraciones de laurel y tomillo, se colocaron dentro de las cajas de Petri en el medio de cultivo inoculado con *S. aureus*, luego los medios fueron preincubados a 5°C durante 12 horas, para permitir la difusión del extracto, y luego, se incubaron a 35°C durante 24 horas.

Los análisis del efecto antimicrobiano de los extractos, se realizaron por triplicado para cada una de las especies vegetales estudiadas y en las diferentes concentraciones. Para establecer los diferentes grados de inhibición del crecimiento bacteriano, se consideraron los rangos de los diámetros de inhibición, como los sugieren Ríos *et al.* (2009).

2. Resultados y discusión

Actividad antimicrobiana: en la Figura 1 se puede observar la presencia de un área próxima al papel de filtro, de forma ligeramente circular, donde no hubo crecimiento de *S. aureus*. En tal caso, cuando el diámetro del papel de filtro impregnado con la solución antimicrobiana extraída de las plantas en estudio, presenta dicho borde, sin crecimiento microbiano, se considera que la sustancia en estudio tiene propiedades antimicrobianas según Pierce y Dennis (2010).

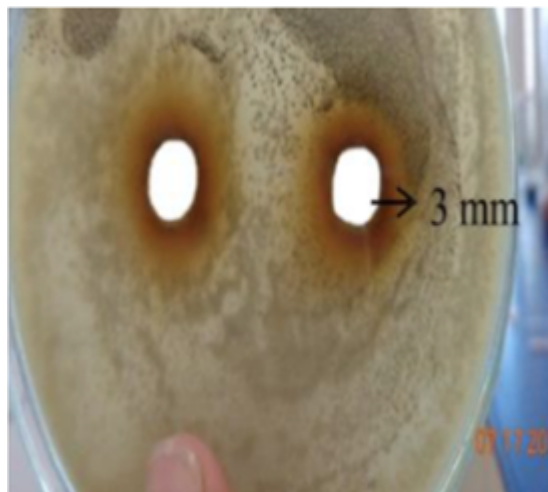


Figura 1. Presencia de halo inhibitorio luego de 24 de incubación.

El *Laurus nobilis*, como se muestra en la Tabla 1, presenta un halo inhibitorio, en concentraciones de 175 y 200 mg/ml, lo cual coincide por lo reportado por Ouibrahim *et al.* (2013), en el cual esta planta tenía efecto inhibitorio en el crecimiento de varias bacterias patógenas gram positivas y gram negativas, incluyendo la misma cepa de este estudio (*S. aureus* ATCC 25923). Sin embargo, la formación del halo reportado por este investigador es superior a los 4 mm. Así mismo, Millezi (2012) y Ghadiri (2014), reportaron la actividad antimicrobiana que tenía *Laurus nobilis*.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana del *Laurus nobilis*

Laurel (mg/ml)	Diámetro del halo inhibitorio (mm)		
	R1	R2	R3
0	(-)	(-)	(-)
25	(-)	(-)	(-)
50	(-)	(-)	(-)
75	(-)	(-)	(-)
100	(-)	(-)	(-)
125	(-)	(-)	(-)
175	(+)	(+)	(+)
200	(+2)	(+2)	(+2)

R=repeticiones, (-)=no se observa halo inhibitorio, (+)=halo inhibitorio de 3.5 mm, (++)=halo inhibitorio de 4mm.

El *Thymus vulgaris*, tal como se puede evidenciar en la Tabla 2, exhibe propiedades antibacterianas a concentraciones de 150, 175 y 200 mg/ml, en tal caso, Millezi et al (2012), reportaron la capacidad antimicrobiana que exhibía el *Thymus vulgaris*, en la cepa *S. aureus* (ATCC 25923), entre otras cepas en estudio, el mismo demostró que a partir de concentraciones de 5 mg/ml se observaba la presencia de un halo inhibitorio. Nadia y Rachid (2013) estudiaron el efecto del tomillo como antioxidante y antibacteriano para el control de bacterias patógenas como *E. coli* y *S. aureus* (ATCC 25923), este último reporto la presencia de halo inhibitorio superior a 15 mm.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana del *Thymus vulgaris*.

Tomillo (mg/ml)	Diámetro del halo inhibitorio (mm)		
	R1	R2	R3
0	(-)	(-)	(-)
25	(-)	(-)	(-)
50	(-)	(-)	(-)
75	(-)	(-)	(-)
100	(-)	(-)	(-)
125	(+)	(+)	(+)
175	(+2)	(+2)	(+2)
200	(+3)	(+3)	(+3)

Según la metodología para establecer los criterios de la determinación de las dosis de concentración mínimas inhibitorias (CMI), establecidas por Rios et al (2009), además, de todas las metodologías descritas por las investigaciones mencionadas anteriormente, en función de extractos antimicrobianos, vale la pena destacar que todos realizaron previamente la extracción con solventes orgánicos del principio activo de las diferentes plantas en estudios incluyendo *Laurus nobilis* y *Thymus vulgaris*, por tal razón, esto pudiera justificar hipotéticamente, que las dosis de la CMI de las investigaciones anteriores no coincidan con las expuestas en esta investigación.

III. CONCLUSIONES

Las especies de plantas vegetales estudiadas en esta investigación (*Laurus nobilis* y *Thymus vulgaris*), muestran una interesante actividad antimicrobiana sobre la cepa de *S. aureus*.

Siendo esta cepa, un patógeno toxico-infeccioso, distribuido ampliamente en diferentes ambientes y presente en muchos alimentos, por deficiencias en su manipulación y tratamiento térmico inadecuado, la implementación de los extractos purificados (aceites esenciales) de estas plantas, representa una alternativa viable para la inhibición o reducción de microorganismos patógenos, en la elaboración de alimentos.

IV. REFERENCIAS

Alerte V, Cortés S, Díaz J, Vollaire J, Espinoza M., Solari V, Cerda J. y Torres M. (2011). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y agua en la Región Metropolitana, Chile (2005-2010). *RevChilInfect*, 29 (1), 26-31.

Azuero A., Jaramillo C., San Martín D y D'Armas H.(2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Ciencia UNEMI*, 9(20), 11 – 18.

Bauer A., Kirby W., Sherris J. and Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing. Depts. Microbiology and Medicine, Univ. Washington, EEUU, *Amer. J. Clin. Pathol.* 6(45),493.

Beristain S., Paluo E. y López A. (2012). Bactericinas: Antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de los alimentos*. 6(2),64-78.

CETTIA. Universidad Técnica Particular de Loja en los años. (2007-2008). "Análisis microbiológico en quesos frescos". Recuperado de: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25404/1/TEsis%20LUIS%20ANTONIO%20PLAZA%20IBARRA.pdf>.

Ghadiri E., Ahmadi R., Moridikiya A., Mahdavi E., and Tavakoli P.(2014). *Laurus nobilis* Has Antibacterial Activity Against *Staphylococcus aureus*. International Conference on Food, Biological and Medical Sciences, Jan. 28-29, Bangkok, Thailand.

Generoso S., Macías S., Fabiani G., Rosas D. y Dallaglio P. (2010). Comportamiento prooxidante y antioxidante de hierbas aromáticas en queso. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Santiago del Estero, Argentina.

- Kaurinovic B., Popovic M. and Vlasisavljevic S. (2010). In Vitro and in Vivo Effects of *Laurusnobilis* L. Leaf Extracts. *JournalMolecules*, (15), 3378-3390.
- Khalid B. (2014). Efecto de la suplementación con plantas aromáticas en leche y queso de cabra de la raza Murciano-Granadina. Tesis Doctoral titulada. Universidad de Murcia. Murcia, España.
- Le Loir Y., Baron F. and Gautier M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2(1), 63-76.
- Millezi A., Caixeta D., Rossoni D., Cardoso M., Piccoli R. (2012) In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *thymus vulgaris*, *cymbopogon citratus* and *laurusnobilis* against five important foodborne pathogens. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 32(1), 167-172.
- Morales A. (2015). Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial del Tomillo (*Thymusvulgaris*) sobre la contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta. Tesis de posgrado. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Nadia Z. and Rachid M. (2013). Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus vulgaris* L. *Medicinal and Aromatic Plant Research Journal*, 1(1), 5-11.
- NTE INEN 1528 (2012). Ecuador: instituto nacional ecuatoriano de normalización. Recuperado de: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1528.2012.pdf>.
- Ollé C., Jagus R. and Gerschenson L. (2014). Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces. *Food Control*, 35, 101-108.
- Ouibrahimi A., Tlili Y., Bennadja S., Amrouni S., Djahoudi A. and Djebbar M. (2013). Evaluation of antibacterial activity of *Laurusnobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. from Northeast of Algeria. *Academic Journals*, 7(42), 4968-4973.
- Pierce S. and Dennis J. (2010). Bacterial culture and antibiotic susceptibility testing. https://vetfolio-vetstreet.s3.amazonaws.com/29/97c5b069be11e09ce70050568d17ce/file/PV0710_hendry_CE.pdf.
- Ríos N., Medina G., Jiménez J., Yáñez C., García M., Di Bernardo M. y Gualtieri M. (2009). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. *Rev. Peru. biol.* 16(1): 097- 100.
- Sharma S. (2015). Food Preservatives and their harmful effects. *International Journal of Scientific and Research Publications*, (5), Issue 4.
- Somasundram C., Razali Z. and Santhirasegaram V. (2015). A Review on Organic Food Production in Malaysia. [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/horticulturae-02-00012%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/horticulturae-02-00012%20(1).pdf).
- Tarekgne E., Skeie S., Rudi K., Skjerdal T. and Narvhus J. (2015). *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* species in milk and milk products from Tigray region, Northern Ethiopia. *African Journal of Food Science*, 9(12), 567-576