

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UN EXTRACTO OLEOSO DE PORO (*Allium ampeloprasum* Var. *porrum*)

Rosa María Dávila-Márquez^{*}, Raúl Ávila Sosa-Sánchez¹, Addí Rhode Navarro-Cruz¹, Viridiana Téllez-Ruiz¹, Martín Álvaro Lazcano-Hernández¹

RESUMEN

Se probó la actividad antimicrobiana de extractos del poro (*Allium ampeloprasum* Var. *porrum*) obtenidos por métodos discontinuos (Tintura) y continuos (Soxhlet), empleando la prueba de difusión en agar y cinéticas de crecimiento bacteriano. Los resultados de la prueba de difusión en agar descartaron el extracto alcohólico por no presentar actividad antimicrobiana. En las cinéticas de crecimiento bacteriano se probaron diferentes concentraciones del extracto oleoso logrando la inhibición de *Escherichia coli* (91%), *Staphylococcus aureus* (72%) y *Bacillus cereus* (65%). Se concluye que el extracto oleoso del poro representa un antimicrobiano natural eficaz *in vitro*.

Palabras clave: extracto, tintura, extracto oleoso, cinética de crecimiento bacteriano.

IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF A PORE OIL EXTRACT (*Allium ampeloprasum* Var. *Porrum*)

ABSTRACT

We tested the antimicrobial activity of extracts of the pore (*Allium ampeloprasum* Var. *porrum*) obtained by discontinuous method (Dye) and continuous (Soxhlet) using the agar diffusion test and kinetics of bacterial growth. The results of the agar diffusion test ruled out the alcoholic extract it not present antimicrobial activity. In the kinetics of bacterial growth are tested different concentrations of oil extract achieving inhibition of *Escherichia coli* (91%), *Staphylococcus aureus* (72%) and *Bacillus cereus* (65%). We conclude that the oil extract of the pore is a natural antimicrobial effective *in vitro*.

Key words: extract, dye, oil extract, kinetics of bacterial growth.

INTRODUCCIÓN

El uso de agentes químicos para prevenir o retardar el deterioro de alimentos deriva en parte del hecho, que tales compuestos son empleados en el tratamiento de enfermedades del hombre, animales y plantas lo cual no implica que todos los agentes quimioterapéuticos puedan ser empleados como conservadores de alimentos. Por otra parte, hay algunos compuestos químicos empleados en la preservación de alimentos que son inefectivos o tóxicos como quimioterapéuticos. Excepto algunos antibióticos, ninguno de los conservadores de alimentos empleados actualmente, tiene uso quimioterapéutico para personas o animales. Aunque un gran número de compuestos han sido descritos como potenciales conservadores, sólo un pequeño número se han empleado en alimentos debido a las estrictas reglas de seguridad dictadas por la Food and Drug Administration (FDA) o por el

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México

^{*} rosamadavila@yahoo.com.mx

hecho que no todos los compuestos que presentan actividad antimicrobiana *in vitro* la conservan al ser adicionados a los alimentos.

Se han aislado alrededor de 12 000 compuestos con actividad antimicrobiana procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen sólo el 10% de los metabolitos secundarios.¹ Probablemente los extractos con poder antimicrobiano mejor caracterizados del reino vegetal son los obtenidos de ajos (*Allium sativum*) y cebollas (*Allium cepa*). Walton y Lovell (1936) indicaron que los agentes volátiles tanto de la cebolla como del ajo inhibían a *B. subtilis*, *Serratia marcescens* y algunas micobacterias en medios microbiológicos. Desde entonces se ha demostrado que el crecimiento y producción de toxinas de muchos microorganismos entre ellos *B. cereus*, *C. botulinum* tipo A, *E. coli*, *Salmonella spp*, *Shigella spp* y *S. aureus*, entre otros, son inhibidos por el ajo y la cebolla². Cavallito y Barley en 1944 aislaron los principales compuestos antimicrobianos del ajo; identificaron el componente antimicrobiano como alicina. La alicina se forma por acción de la enzima aliinasa sobre la aliína. La reacción ocurre sólo cuando las células del ajo están desintegradas liberando la enzima para que actúe sobre el sustrato; una reacción similar ocurre en la cebolla²

El poro o puerro (*Allium ampeloprasum* Var. *porrum*) pertenece a la familia de las Liliáceas en donde están incluidos el ajo y la cebolla, pero a diferencia de los extensos estudios a los han sido sometidos el ajo y algunas variedades de cebolla³ casi no existen referencias al poro, razón por la cual en el presente trabajo se presenta la evaluación antimicrobiana *in vitro* de un extracto oleoso del poro.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Los poros (*Allium ampeloprasum* Var. *porrum*) se obtuvieron en la central de abastos de la ciudad de Puebla. Los criterios de selección para la adquisición de los poros fueron: buen aspecto (sin magulladuras), buen color (blanco en el bulbo y verde glauco las hojas) y sin contaminación. La determinación de género y especie fue realizada por botánicos de la Facultad de Biología de la BUAP por comparación con sus bases de datos. Se empleó la parte comestible del poro (bulbo) al cual se le eliminó la primera capa de hojas; se lavó con agua destilada estéril, cortó en rodajas de entre 0,5 y 1 cm. A una muestra se le determinó humedad en una termobalanza; al resto se le sometió a desecación química (sílica gel), hasta reducir la humedad al 60% para evitar pérdida de compuestos volátiles. El poro desecado se guardó en frascos secos que se almacenaron a temperatura ambiente en un lugar seco y oscuro hasta su empleo.

Las cepas bacterianas utilizadas se adquirieron del cepario de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, a las cuales se les realizaron antibiogramas (BIO – RADSA), tinción de Gram y pruebas bioquímicas^{4,5} para asegurar la identidad de las mismas. Las cepas empleadas fueron: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

El cloranfenicol empleado para los controles positivos fue un estándar secundario proporcionado por el área de farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas.

Preparación de los extractos

El extracto etanólico (tintura) se obtuvo por maceración del poro desecado en etanol 96% en una relación 1:1 p/v; la maceración se realizó a temperatura ambiente durante cinco semanas en un frasco ámbar; al término se filtró la muestra con papel filtro Whatman número 1.

El extracto oleoso se realizó empleando 250 ml de éter etílico y 10 g del poro desecado, en el equipo Soxhlet⁶ hasta completar 12 reflujos, el extracto se evaporó en un rotavapor a sequedad; se pesó un gramo y se le agregó agua hasta obtener un peso final de 10 g, se sonicó por 2 tiempos de 30 minutos a 60 Hertz a fin de obtener una dispersión homogénea.

Actividad antimicrobiana

Las cepas fueron sincronizadas⁷ por pases sucesivos en caldo nutritivo y estandarizadas empleando como referencia el tubo número 1 del nefelómetro de McFarland.⁵

Difusión en agar

Se realizó siguiendo el método de Kirby- Bauer⁸ en agar Müeller-Hinton, empleando penicilindros en lugar de discos de papel; usando un asa de hockey se esparcieron 0,5 ml del cultivo estandarizado en la superficie del agar, en cada penicilindro se colocó 100 µl del extracto respectivo (10%); en la misma placa se corrió un blanco y un control positivo con el antibiótico al que fue sensible la cepa (cloranfenicol).

Cinética de crecimiento

Para realizar la prueba de cinéticas de crecimiento microbiano⁸ se utilizó un baño con agitación (50 rpm), a temperatura constante de 37 °C y matraces nefelométricos estériles; se utilizó un control positivo (bacterias + antibiótico + caldo nutritivo), un testigo (bacterias + caldo nutritivo) y para probar el extracto (bacterias + extracto + caldo nutritivo); el volumen final de cada matraz fue de 50 ml, se probó diferentes concentraciones del extracto y todas se realizaron por triplicado. Se midió la absorbancia cada hora durante un periodo de 9 horas continuas, con la ayuda de un espectrofotómetro a 520 nm (Leitz, Modelo M. serie N° 33812). Los porcentajes de inhibición se obtuvieron comparando el promedio de las absorbancias de la última hora del testigo y el promedio de las absorbancias de la última hora de los matraces con extracto

Análisis estadístico

A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la ayuda del software MINITAB 14 (LEAD Technologies Inc.); se trabajó a un nivel de confianza del 95 % en el cual se analizó las medias de las pendientes de la parte logarítmica de cada una de las curvas de crecimiento y se determinó las diferencias significativas con la prueba de Tuckey.

RESULTADOS

La prueba por difusión en agar demostró que en la fase alcohólica no se encontraban principios activos antimicrobianos, no así en el extracto oleoso que demostró actividad contra las cepas probadas. En el caso de *Bacillus cereus* no se realizó el ensayo de difusión en agar; en la tabla 1 destaca el halo de inhibición con un valor de 8,4 cm contra *E. coli*.

Tabla 1: Diámetro de los halos de inhibición (cm) difusión en agar

Bacteria	Extracto alcohólico	Extracto oleoso
<i>E. coli</i>	0	8,4
<i>Sta. aureus</i>	0	7,4
<i>Bacillus cereus</i>	nd	nd

nd = No determinado

En el caso de las cinéticas de crecimiento se probaron concentraciones de 0,4%, 0,2% y 0,1% (v/v) de las cuales la mejor concentración varió con el microorganismo de prueba; para *E. coli* la más efectiva fue de 0,2% con un porcentaje de inhibición de 91,89%; el análisis estadístico demostró diferencia significativa entre el matraz testigo y los adicionados con el extracto, no así entre las diferentes concentraciones del extracto. En el caso de *Staphylococcus aureus* y

Bacillus cereus la mejor concentración fue de 0,4% con un 72,65% y 65,13% de inhibición, respectivamente. (figuras 1, 2 y 3).

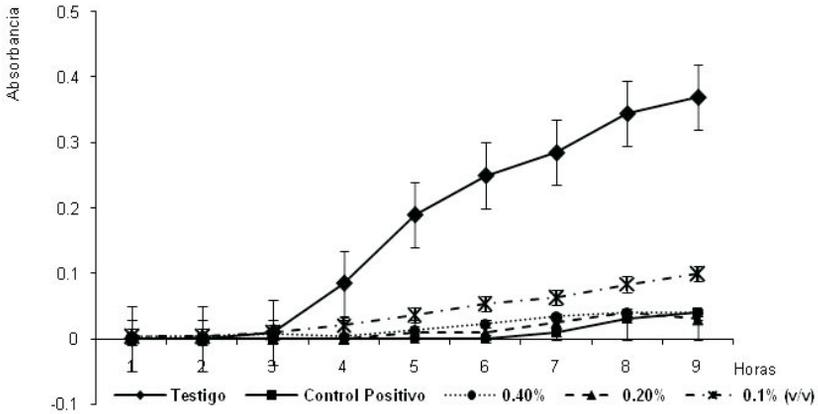


Figura 1: Curva de crecimiento de *Escherichia coli*, en presencia del extracto oleoso del poro. Se muestra el promedio de tres repeticiones y las desviaciones estándar

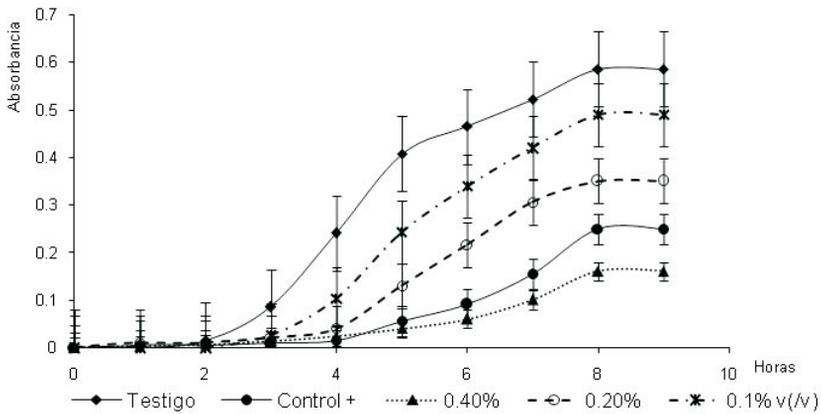


Figura 2: Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en presencia del extracto oleoso del poro. Se muestra el promedio de tres repeticiones y las desviaciones estándar

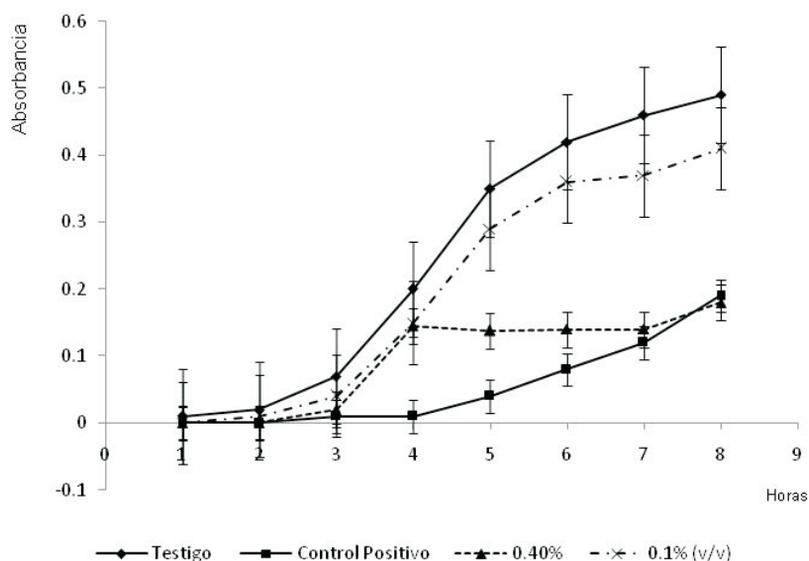


Figura 3: Curva de crecimiento de *Bacillus cereus* en presencia del extracto oleoso del poro. Se muestra el promedio de tres repeticiones y las desviaciones estándar

El análisis estadístico del crecimiento de *Staphylococcus aureus* demostró que la diferencia entre las pendientes es significativa entre las concentraciones 0,2% y 0,4% del extracto y respecto del control positivo; para *Bacillus cereus* existe una diferencia significativa entre la concentración de 0,4% y el control positivo y el testigo. (tablas 2 y 3)

Tabla 2: Análisis estadístico* de medias de las pendientes obtenidas en las cinéticas de crecimiento de los organismos de prueba

Parámetro/Microorganismo	<i>E. coli</i>	<i>Sta. aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Testigo	0,061 ^a	0,100 ^a	0,087 ^a
CONTROL (+)	0,013 ^b	0,040 ^{b,c}	0,037 ^c
EXT. 1 (0,4%)	0,010 ^b	0,028 ^b	nd
EXT. 1 (0,2%)	0,007 ^b	0,059 ^c	0,022 ^b
EXT. 1 (0,1%)	0,015 ^b	0,088 ^a	0,077 ^a

nd = No determinado

* Letras diferentes indican diferencias significativas

Tabla 3: Porcentajes de inhibición obtenidos en presencia del extracto oleoso

Parámetro/Microorganismo	<i>E. coli</i>	<i>Sta. aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
	Porcentaje de inhibición		
0,40%	89,19	72,65	65,13
0,20%	91,89	40,17	nd
0,10%	72,97	16,24	14,86

nd = No determinado

DISCUSIÓN

Los halos de inhibición obtenidos en el ensayo de difusión en agar superan en mucho los marcados por la casa comercial del sensidisco (BIO – RADSA) ya que esta marca 2,4 cm para una cepa sensible lo que nos indica la alta actividad antimicrobiana del extracto del poro; esta técnica es muy utilizada para determinar la efectividad de un antimicrobiano; Burt y Reinder⁹ prueban la actividad antibacteriana de cinco aceites esenciales mediante la prueba de difusión en agar contra *E. coli* y obtuvieron que el aceite de orégano es efectivo contra esta bacteria con 2,4 cm de diámetro en el halo de inhibición; Bayramoglu *et al*¹⁰ encuentran resultados similares al utilizar aceite de orégano contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* utilizando la misma técnica obteniendo halos de inhibición de 4 y 4,5 cm de diámetro, respectivamente; la diferencia entre los halos de inhibición obtenidos tanto por Burt como por Bayramoglu y en este trabajo, radica en las concentraciones utilizadas ya que en el primer trabajo se utilizó el aceite esencial al 1%, mientras que en el segundo al 2% y en este trabajo al 10%; Echemendía *et al*¹¹ demuestran la actividad *in vitro* del propoaramiel contra cepas aisladas de muestras clínicas, entre ellas *Escherichia coli* y *Sta. aureus*, mediante difusión en agar; utilizaron concentraciones similares a las aquí empleadas con resultados satisfactorios.

Las cinéticas de crecimiento presentadas por los microorganismos de prueba presentan, en general, un alargamiento en la fase de latencia y una disminución en la velocidad de reproducción, características de un comportamiento bacteriostático.

La inhibición demostrada contra *E. coli* es muy eficaz ya que comparada con trabajos previos como el de Marroquín *et al*¹², que probaron la actividad antimicrobiana del apio contra esta bacteria, obtuvieron 55% de inhibición, porcentaje que es superado por todas las concentraciones aquí empleadas. Respecto a las concentraciones empleadas, Gutiérrez *et al*¹³ hacen una investigación con aceites esenciales y la combinación de éstos para potenciar el efecto inhibitor sobre bacterias como *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomona aeruginosa*, utilizando concentraciones que van desde 300 ppm hasta 50,000 ppm; las concentraciones empleadas en este trabajo están en este rango, incluso más bajas que las utilizadas por Gutiérrez *et al*; además, el poro por sí sólo presenta buenos porcentajes de inhibición.

El extracto provocó en *Staphylococcus aureus* que la fase de latencia se alargara por tres horas, aproximadamente, y la fase exponencial disminuyera; en las tres concentraciones empleadas sigue un comportamiento similar; por lo tanto se evidencia el efecto bacteriostático: a mayor concentración del extracto disminuye más la velocidad de crecimiento de la bacteria; sin embargo, aunque lento, sigue habiendo crecimiento. Lara *et al*¹⁴ prueban el extracto oleoso de tomatillo contra la misma bacteria obteniendo 23% de inhibición; comparado con el ejemplo anterior el extracto oleoso del poro es más efectivo.

En el caso de *Bacillus cereus* la concentración de 0,4% el extracto logró alargar la fase de latencia hasta las tres horas, disminuir la fase logarítmica y mantenerla casi constante durante casi 4 horas, demostrando una acción bacteriostática efectiva. Manzo *et al*¹⁵ prueban la efectividad del extracto oleoso de brócoli contra esta bacteria utilizando la misma técnica y obteniendo 8% de inhibición; porcentaje que es fácilmente superado por el extracto oleoso del poro; Demo *et al*¹⁶, probaron la actividad antimicrobiana de plantas aromáticas de Argentina contra diversas bacterias mediante la técnica de difusión en agar y encontraron que *Bacillus cereus* es susceptible a *Aloysia triphylla* con una concentración mínima inhibitoria de 0,5 mg/ml, por otro lado, Bonyadian y Moshtaghi¹⁷ obtienen una concentración mínima inhibitoria contra *Bacillus cereus* de 0,3% al probar el aceite esencial de menta por el método de dilución en caldo, provocando alargamiento en la fase de latencia y disminución en la fase logarítmica; lo mismo sucedió en el caso del extracto del poro a 0,4%; además, demuestra que la potencia con que se ejerce el efecto microbiano puede variar de acuerdo a las condiciones que se utilicen, la técnica, la planta, el tipo de extracto y que al utilizarse como un antimicrobiano *in vivo* podría haber otro tipo de factores que intervengan en su acción antimicrobiana.

CONCLUSIONES

Se demostró que el poro presenta principios activos antimicrobianos, que además son de naturaleza no polar, debido a que fue el extracto oleoso del poro, obtenido con un solvente orgánico de baja polaridad, el que demostró mejores resultados.

Las cinéticas de crecimiento bacteriano, corroboraron que las bacterias que se probaron, todas fueron sensibles a los extractos oleosos del poro, siendo la más sensible *E. coli* al inhibirla en un 91%; además, debido al comportamiento que siguieron las bacterias al estar en contacto con el extracto, se puede decir que la acción que ejerce el extracto es bacteriostática.

Estos resultados permiten proponer la necesidad de comprobar si el efecto es realmente bacteriostático o bactericida; además, de realizar estudios *in vivo* e *in situ* empleando sistemas modelo o directamente alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los departamentos de Microbiología y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, los apoyos brindados para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Schultes, R. E. The kingdom of plants. En: Thomson, W.A.E. (Ed.) Medicines from the Earth. McGraw-Hill Book Co., New York. 1978.
2. Doyle M. P., Beuchat L. R., Montville T. J. Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras. Ed. Acribia. España. 2001.
3. García, R. R.O., Herrera, A. F. C. Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar *in vitro*. *BISTUA* 2007; 5 (2): 68-79
4. Macfaddin, M.F. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3a ed. Ed. Médica Panamericana. 2003.
5. Finegold, S. M.; Baron, E. J. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 1989.
6. Kuklinski, C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Ediciones Omega. España. 2003

7. Jawetz E., Melnick J. L., Adelberg E. A. Manual de microbiología. Ed. El manual moderno S. A. México. 1975
8. Madigan M. T. Martinko J. M. Parker J. Biología de los microorganismos. Ed. Prentice Hall. USA. 2000.
9. Burt S.; Reinder R. Antibacterial activity of selected of plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in applied microbiology*. 2003;36: 162-167
10. Bayramoglu E.; Gülümser G.; Karaboz I. The investigation of antibacterial activities of some essential oils in Wet Blue Leather. *International journal of natural and engineering sciences*. 2008; 2 (1): 32-36
- 11.- Echemendía A.; Martínez M.; Carballo L.; Álvarez F.; Gutiérrez M.; Lago A.; Hidalgo P. Actividad "In Vitro" del propoaromiel contra cepas aisladas de muestras clínicas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* número especial 2005;36: sin número
- 12.- Marroquín G. I., Dávila M. R. M., Ávila S-S. R., Lazcano H. M. Identificación de sustancias con actividad antimicrobiana en apio (*Apium graveolens*). *RESPYN Edición Especial* 2006;2:6
13. Gutiérrez C., Barry R., Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions whit food ingredients. *International journal of food microbiology*. 2008; 124: 91-97
14. Lara S. A., Dávila M. R., Navarro C. A., Ávila S. R. Determinación de la actividad antimicrobiana del tomatillo (*Physalis ixocarpa*). *RESPYN Edición Especial* 2008; 2: 103
15. Manzo. M. J., Dávila M. R. M., Ávila S-S. R., Navarro C. A. R. Evaluación antimicrobiana del brócoli (*Brassica oleracea* Var. *Itálica*.)XIV XVI Seminario latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de los alimentos. Presentación en cartel. Habana, Cuba. 2006.
16. Demo M.; Oliva M.; López M.; Zunino M.; Zygadlo J. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. *Pharmaceutical biology*. 2005; 43(2): 129-134
17. Bonyadian M.; Moshtaghi H. Bactericidal activity of some plants essential oils against *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. *Research journal microbiology*. 2008; 3 (11): 648-653.