

Actividad bactericida del extracto etanólico de *Aloysia citridora* "cedrón" en bacterias alteradoras de carne fresca

Bactericidal activity of the ethanolic extract of *Aloysia citridora* "cedrón" in spoilage bacteria of fresh meat

Flor Teresa García Huamán¹, Marleny Angeles Trauco²

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad bactericida del extracto etanólico de *Aloysia citridora* "cedrón" en bacterias alteradoras de carne. Se utilizó como muestra biológica carne fresca (vacuno, pollo y pescado). Se preparó el extracto etanólico utilizando 100g de hoja triturada con un litro de etanol, macerado por 8 días a temperatura ambiente. El filtrado de la maceración se sometió a evaporación por 72 horas a 42 °C. Se trabajó con un grupo control (10g de carne y 90 ml de agua destilada) y un grupo experimental (10g de carne y 90 ml de extracto etanólico), luego se procedió a las siembras microbianas. Se encontró que el halo de inhibición promedio, de crecimiento para *Staphylococcus aureus* fue de 12mm, lo que demuestra la propiedad antibacteriana de *Aloysia citridora* para *Staphylococcus aureus*, además se observó inhibición de crecimiento bacteriano en agar Macconkey y agar nutritivo, en los grupos experimentales, mientras que en el grupo control se observó crecimiento. Respecto a los recuentos en agar nutritivo el mayor valor fue de 1.21×10^3 ufc/ml para el grupo control con carne de pollo. Se concluye que el extracto etanólico de *Aloysia citridora* tiene actividad bactericida en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, bacterias alteradoras de carne fresca.

Palabras clave: Actividad bactericida, extracto etanólico

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to determine the bactericidal activity of the ethanolic extract of *Aloysia citridora* "cedrón" in meat spoilage bacteria. Fresh meat (beef, chicken and fish) was used as biological sample. The ethanolic extract was prepared using 100g of crushed leaf with one liter of ethanol, macerated for 8 days at room temperature. The filtrate from the maceration was subjected to evaporation for 72 hours at 42 °C. We worked with a control group (10g of meat and 90 ml of distilled water) and an experimental group (10g of meat and 90 ml of ethanolic extract), then proceeded to microbial seeding. It was found that the average growth inhibition halo for *Staphylococcus aureus* was 12mm, which demonstrates the antibacterial property of *Aloysia citridora* for *Staphylococcus aureus*, in addition bacterial growth inhibition was observed in Macconkey agar and nutrient agar, in the experimental groups, while in the control group growth was observed. Regarding the counts in nutrient agar, the highest value was 1.21×10^3 cfu/ml for the control group with chicken meat. It is concluded that the ethanolic extract of *Aloysia citridora* has bactericidal activity on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, fresh meat spoilage bacteria.

Keywords: Bactericidal activity, ethanolic extract

¹Docente de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza. Correo electrónico: flor.garcia@untrm.edu.pe

²Técnica de Laboratorio. Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza. Correo electrónico: marleny.angeles@untrm.edu.pe

I. INTRODUCCIÓN

Algunas investigaciones se enfocan en la búsqueda de nuevos aditivos alimentarios, como son los extractos de hojas de plantas. Sin embargo, su composición y bioactividad están influenciados por el solvente y el método de extracción utilizado durante su obtención, ya que los extractos de hojas de plantas obtenidos con solventes polares y métodos de extracción no convencionales, muestran mayor contenido de fitoquímicos, actividad antioxidante y actividad antibacteriana (Ramírez, et al., 2018).

Londoño y López (2016), estudiaron la actividad bactericida y fungicida in vitro de extractos etanólicos y el obtenido con acetato de etilo al 2% de *Tithonia diversifolia*, realizaron extracciones usando los solventes etanol, acetato de etilo y hexano. Se hicieron las pruebas de sensibilidad y concentración mínima inhibitoria *In vitro*, determinando que la bacteria *S. aureus* presentó sensibilidad frente a los extracto etanol y acetato de etilo de *Tithonia diversifolia*. Los demás organismos presentaron nula sensibilidad a los extractos.

Córdova, et. al. 2016, estudiaron la actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto hexánico proveniente de la raíz de *Salvia apiana*. Los extractos de salvia a las concentraciones de 27; 13,5; 6,8 y 3,4 mg/ml causaron inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Sin embargo, no presentaron efecto significativo sobre *Escherichia coli* y *Candida tropicalis*.

Mathews, 2007, evaluó la actividad bactericida y fungicida de extractos crudos de cuatro especies forestales *C. spruceanum*, *S. mombin*, *C. odorata* y *J. copaia*, determinando su concentración inhibitoria mínima (CIM) en mg/ml frente a cepas indicadoras de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. Los extractos crudos acuosos de *C. spruceanum*, *S. mombin*, *C. odorata* demostraron tener actividad inhibitoria frente a bacterias en concentraciones de 5 a 50 mg/ml y los de *J. copaia* mostraron escasa actividad antimicrobiana.

Aloysia citridora, conocida como cedrón, es una planta de la familia Verbenacea, originaria de America del Sur, se cultiva como planta ornamental y por sus propiedades medicinales. Los extractos de *Aloysia citridora* son ricos en fenilpropanoides, especialmente verbascósido que presentan actividad biológica como antioxidantes y bactericidas.

La mayoría de los microorganismos en carne son Gram positivas mesófilos como: *micrococcus*, *Staphylococcus* y *Bacillus*. Una fracción algo menor está compuesta por bacterias gram negativas (*Escherichia coli*), psicrófilos originados en el suelo, agua, vegetación (Rodríguez y Aparicio, 2018)

En la actualidad ha surgido la necesidad de buscar alternativas de conservación de los alimentos, esto debido a que se ha asociado el consumo de conservadores químicos con intoxicaciones. La demanda de productos frescos mínimamente tratados está aumentando, así como el interés por los agentes antimicrobianos de origen natural (derivados de vegetales), por esto en la actualidad se busca la combinación de dos o más factores que interaccionen aditiva o sinérgicamente controlando a la población microbiana, permitiendo con esto productos semejantes al producto fresco pero con menos aditivos (Rodríguez, 2011)

Actualmente se ha puesto especial atención a compuestos biológicamente activos extraídos de diversas especies de plantas tradicionales empleadas en la medicina herbolaria como una posible alternativa para la eliminación de microorganismos (Córdova, et. al. 2016).

En general, cada vez se descubren más plantas o partes de estas que contienen antimicrobianos naturales, por ejemplo los que incluyen compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas, se tendrá mayor seguridad y mejor calidad de los alimentos ya que este tipo de antimicrobianos se consideran como fuentes potencialmente seguras (Rodríguez, 2011).

El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos con fines antimicrobianos, sin que afecte negativamente a las características sensoriales (Rodríguez, 2011).

Aloysia citridora es una planta cultivable en la región Amazonas, sus hojas contienen aceite esencial, cuyo componente principal es el citral, además limoneo, linalol, cineol, terpinol y cariofileno, un aldehído sesquiterpénico al que se le atribuye acción euféptica y espasmolítica. También se ha encontrado que tiene propiedades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus*.

II. MATERIAL Y MÉTODO

Se aplicó el diseño experimental con dos grupos después y grupo control. La muestra biológica estuvo constituida por carne de vacuno, carne de pollo, carne de pescado.

Para obtener el extracto de *Aloysia citridora* “cedrón”, se recolectaron las plantas del anexo Taquia, ubicado en el distrito de Chachapoyas, departamento de Amazonas, Perú, se utilizaron bolsas de primer uso, las mismas que fueron transportadas al laboratorio de Tecnología Agroindustrial de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Se pesó 4 Kg. de hojas y se lavó con agua destilada estéril. Posteriormente se secó a temperatura ambiente, sin exposición solar para su deshidratación por 24 horas. Luego se colocó en una estufa a 37°C por 24 horas. (Pimentel et al., 2015), (Azüero, et al., 2016).

Los 4kg de hojas secas fueron extendidas en una mesa y se seleccionaron las hojas libres de hongos. Luego se pulverizaron en una trituradora y se colocaron en un frasco de vidrio y se le agregó 1L. de etanol químicamente puro (QP) por cada 100g. de hoja triturada. Se almacenó a temperatura ambiente por un lapso de 8 días para su maceración. (Pimentel et al., 2015). El macerado se filtró usando un papel de filtro Whatman N°40, los remanentes se dejaron en maceración por 8 días y luego se filtraron con la misma técnica. Posteriormente el filtrado fue sometido a evaporación a 40°C por 72 horas para extraer el etanol; logrando una evaporación de aproximadamente el 80%. Al extracto etanólico se le realizó la prueba de esterilización utilizando caldo tioglicolato, para evidenciar de ser el caso, crecimiento microbiano a través del enturbiamiento del medio de cultivo (Pimentel et al., 2015).

Para el tratamiento del grupo control se colocó 10g. de carne (vacuno, pollo, pescado) en 90 ml. de agua destilada estéril (dilución 10⁻¹). Luego se sembró en agar Mac Conkey y agar para estafilococos. Se realizó el recuento bacterino en agar nutritivo.

En el grupo experimental se colocó 10g. de carne (vacuno, pollo, pescado) en 90 ml. de extracto etanólico. Se dejó reposar por 24 horas y posteriormente se retiró la muestra de carne y se colocó sobre un papel absorbente estéril. Luego se sembró en agar Mac Conkey y agar para estafilococos. Se realizó el recuento en agar nutritivo.

La actividad bactericida se determinó en función a la inhibición o disminución del crecimiento bacteriano en agar Mac Conkey o agar estafilococo y al número de unidades formadoras de colonia por mililitro en el recuento bacteriano en las placa de agar nutritivo.

Se realizó el antibiograma y se midió los halos de inhibición. Las zonas claras que se formaron alrededor de los discos, se consideraron halos de inhibición, los cuales fueron medidos, registrando para cada uno el diámetro en milímetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano. (Azüero, et al., 2016).

Tabla 1

Grados de inhibición del crecimiento bacteriano.

Grados de inhibición	Rangos de diámetro
Ninguna actividad antimicrobiana	(-) Menor 6 mm.
Poca actividad antimicrobiana	(1+) 6-8 mm.
Mediana actividad antimicrobiana	(2+) 8-10 mm.
Alta actividad antimicrobiana	(3+) 10-14 mm.

III. RESULTADOS

Tabla 2

Presencia y recuento de bacterias en carne fresca de vacuno en grupo control y experimental.

Grupo	Presencia(+)/Ausencia(-)						Recuento(ufc/ml)			
	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			Bacterias mesófilas viables			
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	Promedio
Control	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	98x10 ¹ {980}	9.88x10 ² {988}	94x10 ¹ {940}	96.9x10 ¹ {969}
Experimental	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	0	0	0

La tabla 2, muestra el crecimiento de *Escherichia Coli* y *Staphylococcus aureus* en el grupo control (+) pero no en el grupo experimental (-). El grupo control presenta en promedio un recuento de bacterias aerobias mesófilas viables de 96.9x10¹ UFC/ml., mientras que en el grupo experimental no se presenta crecimiento de bacterias mesófilas viables, para la muestra carne fresca de vacuno.

Tabla 3

Presencia y recuento de bacterias en carne fresca de pollo en grupo control y experimental.

Grupo	Presencia(+)/Ausencia(-)						Recuento(ufc/ml)			
	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			Bacterias mesófilas viables			
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	Promedio
Control	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1.23x10 ³ {1230}	1.22x10 ³ {1220}	1.2x10 ³ {1200}	1.216x10 ³ {1216}
Experimental	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	0	0	0

La tabla 3, se observa el crecimiento de *Escherichia Coli* y *Staphylococcus aureus* en el grupo control (+) pero no en el grupo experimental (-). El grupo control presenta en promedio un recuento de bacterias aerobias mesófilas viables de 1.216x10³ UFC/ml., mientras que en el grupo experimental no se presenta crecimiento de bacterias mesófilas viables, para la muestra carne fresca de pollo.

Tabla 4

Presencia y recuento de bacterias en carne fresca de pescado en grupo control y experimental.

Grupo	Presencia(+)/Ausencia(-)						Recuento(ufc/ml)			
	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			Bacterias mesófilas viables			
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	Promedio
Control	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	68x10 ¹ (680)	66x10 ¹ (660)	68x10 ¹ (680)	67.3x10 ¹ (673)
Experimental	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	0	1x10 ¹ (10)	0,33x10 ¹ (3.3)

En la tabla 4, se evidencia el crecimiento de *Escherichia Coli* y *Staphylococcus aureus* en el grupo control (+) pero no en el grupo experimental (-). El grupo control presenta en promedio un recuento de bacterias aerobias mesófilas viables de 67.3x10¹ UFC/ml., mientras que en el grupo experimental se presenta un crecimiento de bacterias mesófilas viables de 0.33x10¹ UFC/ml, para la muestra carne fresca de pescado.

Tabla 5

Diámetro de halo de inhibición (mm) en placas con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Microorganismo	Diámetro de Halo de Inhibición (mm)			PROMEDIO
	R1	R2	R3	
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	10.5	13.5	12 mm

En la tabla 5, se muestra que el halo de inhibición promedio, de crecimiento de *Escherichia Coli* es 0mm y de *Staphylococcus aureus* es 12mm.

IV. DISCUSIÓN

La carne fresca es reconocida como un producto alimenticio altamente perecedero debido a su composición biológica. El crecimiento microbiano y el metabolismo muscular dependen de las condiciones de los canales al momento del sacrificio, del tipo de envasado utilizado y las condiciones de almacenamiento. Las tecnologías de preservación de la carne tratan mayormente de inhibir el deterioro microbiano (Buitria, 2017).

Los alimentos constituyen un medio idóneo para las bacterias porque les proveen de nutrientes y humedad y hacen que los alimentos se alteren y no sean adecuados para el consumo, causan la putrefacción de carnes y pescados. Son las denominadas bacterias alterantes, que estropean el alimento y limitan, con la ayuda de reacciones fisicoquímicas, la vida útil del alimento.

Existen bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*) que son alterantes de los alimentos y en especial de la carne fresca (carne de pollo, carne de vacuno, carne de pescado), por ello se recurre a la búsqueda de sustancias antimicrobianas para alargar el tiempo de vida útil del alimento.

Las plantas y sus propiedades antimicrobianas, últimamente han recibido mucha atención de los científicos, ya que presentan actividad antibacteriana capaz de combatir agentes patógenos como *Staphylococcus aureus* (Moromi, et al., 2009).

Se han realizado diversos estudios de los componentes de la planta encontrando metabolitos

secundarios que han dado respuesta positiva en el control de los diferentes microorganismos; lo que permite tener un conocimiento sobre el potencial que tiene el material vegetal como agente antimicrobiano (Londañó, et al. 2016), esta afirmación se corrobora en la presente investigación donde el extracto etánolico de *Aloysia citridora* tiene actividad bactericida en las bacterias alteradoras de carne fresca como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, observándose ausencia de crecimiento de estas bacterias en el grupo experimental.

Los metabolitos secundarios de las plantas pertenecen a tres grupos, según sus orígenes biosintéticos: 1) Los terpenoides, entre ellos se encuentran los aceites esenciales 2) Los compuestos fenólicos y sus derivados donde destacan los flavonoides, 3) Los componentes nitrogenados o alcalinos. Todos estos grupos contienen metabolitos con propiedades antimicrobianas.

Las fitoalexinas son metabolitos secundarios de naturaleza química diversa, principalmente flavonoides, de bajo peso molecular que se sintetizan en los vegetales ante una infección microbiana. Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos que se acumulan en algunas plantas en altas concentraciones, después de infecciones bacterianas, se sintetizan muy rápido en pocas horas después del ataque microbiano, son tóxicas a un espectro amplio de bacterias patógenas. En general las fitoalexinas no son potentes antibióticos y son de baja especificidad, muchas son biocidas y otras tienen efectos bioestáticos.

De forma general, los metabolitos secundarios se agrupan en terpenos, compuestos fenólicos,

alcaloides y glucósidos, todos estos se sintetizan a partir de diferentes rutas, es decir en la síntesis de terpenos, participan la ruta del ácido mevalónico y la ruta de la deoxi-xilulosa fosfato. Por su parte la ruta del ácido shikímico y del ácido malónico están involucrados en la síntesis de compuestos fenólicos o polifenoles mientras que los alcaloides, son sintetizados a partir de una red metabólica más compleja que involucra a las rutas del mevalonato, ácido shikímico, ácido malónico y mezclas de estas. Dentro de los compuestos fenólicos o polifenoles, las cumarinas son probablemente algunos de los productos naturales más abundantes (Venancio et al., 2021).

Al igual que a la mayoría de los metabolitos secundarios, a las cumarinas se les atribuye un papel como parte del sistema de defensa de las plantas, ya que muchas de estas se ha demostrado que poseen actividad bactericida (Venancio et al., 2021).

En la investigación de Modak, et al. (2001), sobre actividad antibacteriana de flavonoides aislados de *Heliotropium sinuatum*, se encontró que presentan actividad antibacteriana en *Escherichia coli* K-12, se logró cuantificar la actividad antibacteriana de los compuestos aislados de la resina.

Los extractos etanólicos de plantas medicinales contienen metabolitos secundarios que le confiere propiedades antimicrobianas para bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*) y bacterias aerobias mesófilas viables, debido a ello, en la presente investigación se encontró crecimiento de las bacterias antes mencionadas en el grupo control a diferencia de la ausencia de crecimiento microbiano en el grupo experimental (carne de pollo, carne de vacuno y carne de pescado) que fue tratado con extracto etanólico de *Aloysia citridora*.

El recuento de bacterias aerobias mesófilas viables en la carne fresca de vacuno, fue de 96.9×10^1 UFC/ml. para el grupo control, mientras que en el grupo experimental no se presentó crecimiento de bacterias mesófilas viables. En la carne fresca de pollo, el recuento de bacterias aerobias mesófilas viables en el grupo control fue de 1.216×10^3 UFC/ml., mientras que en el grupo experimental no se presentó crecimiento de bacterias mesófilas viables.

A diferencia de la muestra de carne fresca de pescado, donde existió crecimiento tanto en el grupo control como en el grupo experimental, presentando en promedio un recuento de bacterias aerobias mesófilas viables de 67.3×10^1 UFC/ml. y 0.33×10^1 UFC/ml, respectivamente, esto se puede justificar al alto contenido de microorganismos en la carne de pescado por ser un alimento altamente perecedero y por el contenido de metabolitos secundarios de la planta que depende las etapas de desarrollo y

procesos fisiológicos de la planta.

En el estudio fitoquímico del aceite esencial de *Aloysia aloysioides* y su evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica, realizado por Huanca (2021), se encontró que existe actividad antibacteriana para *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 19 mm. mientras que para *Escherichia coli* no se encontró halo de inhibición, resultados similares se encontraron en la presente investigación pero con extractos etanólicos de *Aloysia citridora*, donde el halo de inhibición promedio, de crecimiento *Staphylococcus aureus* fue de 12mm, lo que demuestra la propiedad antibacteriana de *Aloysia citridora* para *Staphylococcus aureus* pero no para *Escherichia coli* que no presentó halo de inhibición, probablemente porque la concentración bacteriana fue muy alta en relación a la concentración de extracto etanólico utilizado en el disco de antibiograma o por que la planta utilizada no había completado sus etapas de desarrollo.

V. CONCLUSIONES

El extracto etanólico de *Aloysia citridora* tiene actividad bactericida en las bacterias alteradoras de carne fresca como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, observándose ausencia de crecimiento en el grupo experimental.

El recuento de bacterias aerobias mesófilas viables es de 96.9×10^1 UFC/ml. para el grupo control, mientras que en el grupo experimental no se presenta crecimiento de bacterias mesófilas viables, en la muestra carne fresca de vacuno.

En la carne fresca de pollo, el recuento de bacterias aerobias mesófilas viables en el grupo control es de 1.216×10^3 UFC/ml., mientras que en el grupo experimental no se presenta crecimiento de bacterias mesófilas viables.

En la muestra de carne fresca de pescado, existe crecimiento tanto en el grupo control como en el grupo experimental, presentando en promedio un recuento de bacterias aerobias mesófilas viables de 67.3×10^1 UFC/ml. y 0.33×10^1 UFC/ml, respectivamente.

El halo de inhibición promedio, de crecimiento *Staphylococcus aureus* es 12mm, lo que demuestra la propiedad antibacteriana de *Aloysia citridora* para *Staphylococcus aureus* pero no para *Escherichia coli* que no presentó halo de inhibición.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azuero A., Jaramillo C., San Martín, D., D'Armas H. (2016). *Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en el Ecuador. Revista Ciencia UNEMI* 9(20),11-18.
- Buitria L. (2017). *Vida útil de la carne: Influencia del envasado y sistema de producción.* <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/7130/1/luzardo-Buiatria-2017.pdf>
- Córdova I., Aragón O., Díaz L., Franco S., Serafin N., Pozos A., Soto T., Martínez F., Isiordia M. (2016). *Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de Salvia apiana frente a microorganismos de importancia clínica. Revista Argentina de Microbiología* 48(3):217-221.
- Huanca C. (2021). *Estudio fitoquímico del aceite esencial de la Aloysia aloysioides Loes & Moldenkey y su evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica.* [Tesis de pregrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química. Escuela Profesional de Química]. Repositorio Institucional Cybertesis UNMSM.