

## Evaluación de la Capacidad Antimicrobiana del Aceite Esencial de Orégano (*Origanum vulgare*) Microencapsuladas en $\beta$ -ciclodextrina Aplicados en Cultivos Microbianos

Matos-Chamorro Alfredo<sup>1</sup>; Quispe-Condori, Socrates<sup>1</sup>; Quito-Vidal, Moisés Rosulo<sup>1</sup> ;  
Beltrán-Cárdenas, Susy Keyla<sup>2</sup>

### Resumen

El presente trabajo tuvo por objetivo, evaluar la actividad antimicótica del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*). Se extrajo aceite esencial de orégano por hidrodestilación teniendo como rendimiento 1.2 + 0.5 %. Se encapsuló 0.0496 g de aceite esencial de orégano en 1 g de  $\beta$ -ciclodextrina. Haciendo uso del medio nutritivo APoX, se cultivó levadura pura presente en frutas así como mohos y levaduras presentes en cáscaras de tomate. En el experimento se utilizó 0.025 g de aceite esencial puro y aceite esencial encapsulado en  $\beta$ -ciclodextrina. Para la determinación del poder inhibitorio de mohos y levaduras del aceite esencial de orégano se usó el método de difusión en agar y el método de difusión en agar puro usando como soporte un papel filtro con un diámetro de 2 cm el cual fue colocado sobre el agar después de la siembra. Se obtuvo mejores resultados por el método del papel filtro y aceite esencial no encapsulado, con un halo de inhibición de 1.7 cm, no se evidenció diferencias respecto al tipo de cultivo (levadura pura o mohos y levaduras presentes en tomate). Respecto al empleo del aceite esencial encapsulado se puede decir que no tuvo un efecto significativo ya que el medio de cultivo se encontraba con una humedad muy elevada, humedeciendo excesivamente las cápsulas de la  $\beta$ -ciclodextrina diluyendo la liberación y acción del aceite esencial.

**Palabras Clave:** Aceite esencial, Orégano, *Origanum vulgare*, ciclodextrina.

### Evaluation of antimicrobial activity of essential oils of oregano (*Origanum vulgare*) $\beta$ -cyclodextrin microencapsulated in applied microbial cultures

### Abstract

The aim of this study is to evaluate the antifungal activity of essential oil oregano (*Origanum vulgare*). The essential oil oregano was extracted by hydrodistillation producing a 1.2 + 0.5% yield. 0.0496 g of encapsulated essential oil of oregano was found to be present in 1 g of  $\beta$ -cyclodextrin. In experiments using 0.025 g of pure essential oil and essential oil encapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin; using the nutrient medium APoX, pure yeast culture was found to be present in fruits as well as mold and yeast in tomato peel. To determine the inhibitory power of molds and yeast, the essential oil of oregano was used for the Agar Diffusion Method and Agar Pure Diffusion Method using filter paper as support with a diameter of 2 cm which was placed above the agar after the seeding. Best results were obtained using the method of filter paper and non-encapsulated essential oil with an inhibition halo of 1.7 cm, no evidence of differences in crop type (pure yeast or mold in tomato) were found. Regarding the use of encapsulated essential oil it can be said that it had no significant effect as the culture medium was found to have an extremely high moisture level which quickly dampened the  $\beta$ -cyclodextrin and prevented the release of the essential oil.

**Keywords:** Essential oil, Oregano, *Origanum vulgare*, cyclodextrin.

### Introducción

La búsqueda de componentes naturales para reemplazar las sustancias sintéticas se han incrementado en los últimos años. Varios estudios demuestran que los conservantes usados en la

industria de alimentos, en su mayoría sintéticos, presentan en su composición sales de sodio, potasio, magnesio, que si bien han ampliado grandemente la vida útil de los alimentos, no obstante, pueden ser perjudiciales para la salud, ya que ayudan a padecer males como la hipertensión arterial y problemas renales.

Los extractos naturales, así como los aceites

<sup>1</sup>Universidad Peruana Unión. alfredom@upeu.edu.pe; socratesq@gmail.com ; ecoli@

<sup>2</sup>E.A.P. de Ingeniería de Alimentos, Universidad Peruana Unión. queylla@gmail.com

esenciales de los vegetales, son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles y semillas. Químicamente, son mezclas complejas compuestas por: monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanos, además muestran actividad antimicrobiana (Martínez 2003).

Originalmente, los aceites esenciales fueron utilizados como agentes terapéuticos. Debido a su olor y aroma, muchos otros fueron utilizados como ingredientes básicos en las industrias de perfumes, jabones, desinfectantes y productos similares. En la industria de los alimentos son extensivamente usados como saborizantes en una amplia variedad de alimentos y bebidas. Además, debido a su actividad antimicrobiana, diversos investigadores como Holley y Patel (2005) y Burt (2004) han mostrado interés en su uso como conservantes alternativos sanos y efectivos, en comparación con los conservantes sintéticos.

Entre las plantas utilizadas como fuentes de aceites esenciales para conservación de alimentos están el clavo de olor (Vrinda Menon y Garg 2001), orégano (Skandamis y Nychas 2001; Harpaz y otros 2003), culantro (Gill y otros 2002), mostaza (Lemay y otros 2002), entre otros.

La composición química de los aceites esenciales extraídos de estas plantas juega un papel fundamental en su capacidad antimicrobiana (Alzoreky y Ankara 2002). De manera general, los grupos fenólicos son altamente efectivos. Entre estos, los aceites de clavo de olor, orégano, romero, tomillo, salvia y vainilla fueron más efectivos contra los microorganismos, inhibiendo principalmente las bacterias Gram-positivas en comparación con las Gram-negativas (Mangena y Muyima 1999; Marino y otros 2001). Existen también algunos compuestos no fenólicos efectivos (alil isotiocianato, AIT, de aceite de ajo) contra bacterias Gram-negativas (Yin y Cheng 2003) y contra muchos hongos Gram-positivos (Nielsen y Rios 2000). Los aceites con altos niveles de eugenol (pimienta de jamaica, clavo de olor y canela), aldehído (corteza de la canela,

aceite de casia) y cítricos son por lo general fuertes antimicrobianos (Davison y Naidu 2000). La actividad de la salvia y romero es debido al borneol y otros compuestos fenólicos en la fracción terpenoide (canfora, 1,8 cineol, alfa-pineno, canfona, verbenota y acetato de bornil) (Davidson y Naidu 2000). Los terpenos volátiles carvacrol, p-cimeno y timol son probablemente los responsables por la actividad antimicrobiana del orégano, tomillo y ajedrea (Davidson y Naidu 2000).

Se ha mostrado que el aceite esencial de orégano tiene actividad contra las bacterias gram-negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella cholerae suis* y *Vibrio cholerae* y las bacterias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, con diferentes grados de sensibilidad (Albado y otros 2001).

Varios trabajos de investigación demuestran que el aceite esencial de orégano es un antimicótico con capacidad de inhibición de toda cepa fúngica. Carmo y otros (2008) muestran que concentraciones de 80 y 40 µl/ml de aceite esencial de orégano inhiben el crecimiento de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. terreus* and *A. fumigatus*) presente en los alimentos, Llegando a la conclusión de que el aceite esencial de orégano puede ser usado como un anti-aspergillus y que puede ser utilizado en la conservación de alimentos.

Los aceites esenciales de tomillo, orégano, dictamo blanco y mejorana inhibieron totalmente el crecimiento de *Penicillium digitatum* (Daferera y otros 2000).

A pesar que los aceites esenciales vienen recibiendo especial atención como conservantes en la industria de alimentos, aún existen interrogantes en relación a su forma de aplicación (Holley y Patel 2005).

El aceite esencial puede presentar algunas dificultades en su utilización como conservantes, estas pueden ser: impregnación en el producto alimenticio, volatilización rápida del aceite, estas dificultades podrían solucionarse a través de un

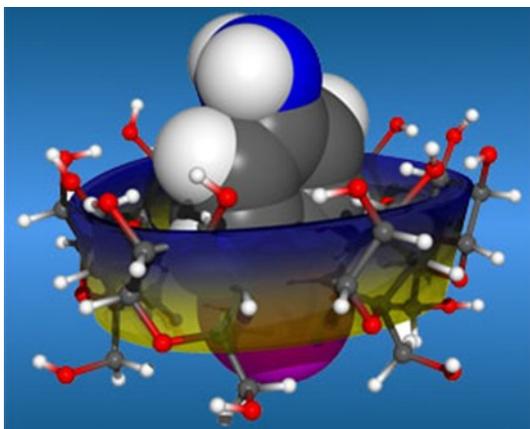
soporte que contenga en su interior el aceite esencial y que permita su liberación paulatinamente.

Bhandari y otros (1998) proponen una alternativa de microencapsulación de aceite esencial en  $\beta$ -ciclodextrina. La literatura es limitada en relación al uso de microcápsulas de  $\beta$ -ciclodextrina + aceite esencial como conservantes (Ayala-Zavala y otros 2007).

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos derivados del almidón modificado enzimáticamente. Están formados por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4). De acuerdo al número de unidades de glucosa (n), las CD son nombradas con una letra griega diferente:  $\alpha$ -Ciclodextrina (n = 6),  $\beta$ -Ciclodextrina (n = 7),  $\gamma$ -Ciclodextrina (n = 8),  $\delta$ -Ciclodextrina (n = 9). Entre ellas, las más comunes son las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -CD, y desde 1998 la  $\beta$ -ciclodextrina es considerada como producto GRAS (Szente y Szejtli 2003).

La cavidad interna de la  $\beta$ -CD es hidrofóbica, y es ahí donde se hace la inclusión de los aceites esenciales, formándose un complejo aceite esencial +  $\beta$ -ciclodextrina (microcápsula), (Figura1). Como complejo, la  $\beta$ -ciclodextrina ofrece protección a los compuestos encapsulados, los cuales pueden ser liberados controlando la humedad del ambiente.

Esto se debe a que el lado exterior de la  $\beta$ -CD es



**Figura 1 - Encapsulamiento de aceite esencial en  $\beta$ -ciclodextrina (Szente y Szejtli 2003)**

hidrofílico (la parte externa capta la humedad del ambiente), lo que posibilita que moléculas de agua debiliten la unión del complejo, liberando los componentes del aceite esencial. Los compuestos liberados de manera continua y prolongada pueden proteger a los alimentos contra el crecimiento microbiano, afectando o no su calidad sensorial (Szente y Szejtli 2003).

La presente investigación es una respuesta a la creciente tendencia del consumo de alimentos naturales, con especial atención al empleo del aceite esencial de orégano como conservante natural, la formulación de una tecnología de conservación alternativa, a través del uso de sistemas que permitan la liberación de los aceites esenciales, tales como, microcápsulas de  $\beta$ -ciclodextrina es una propuesta innovadora.

El objetivo de esta investigación es comparar la actividad antimicótica del aceite esencial de orégano puro y el aceite esencial de orégano encapsulado en  $\beta$ -ciclodextrina.

## Materiales y Métodos

El trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios de investigación en tecnología de alimentos (CITAL), centro de investigación en ciencia de alimentos (CICAL) y en el laboratorio de procesos, pertenecientes a la facultad de ingeniería y arquitectura de la universidad Peruana Unión (UPeU).

Las materias primas usada son: el orégano (*Oreganum vulgare*) de la ciudad de Tacna,  $\beta$ -Ciclodextrina grado alimento, adquirido en la empresa Cyclodextrin Technologies Development.

## Extracción del aceite esencial de orégano

La extracción de aceite esencial de orégano fue realizada a partir de las hojas secas enteras. Se pesaron 100 g de hojas secas de orégano y fueron depositadas en el balón de 1000 mL junto con 600 mL de agua destilada. El balón fue acondicionado con el Aparato Schilcher y la solución fue llevada a ebullición con ayuda de una manta de calentamiento (TECNAL, modelo TE – 2761315, Brasil). Conforme se calienta la materia

prima va liberando el aceite esencial contenido y éste, a su vez, debido a su alta volatilidad se va evaporando. Al ser soluble en el vapor circulante, es “arrastrado”, corriente arriba hacia el tope del hidroddestilador. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador donde es enfriada, hasta la temperatura ambiente. La separación del aceite y agua se realizó a través de la congelación. El tiempo del proceso de extracción fue de 2 ½ horas (Cerpa M. 2007; Parry 1921; Heath and Reineccius 1986).

### Encapsulamiento del aceite esencial del orégano

Las microcápsulas de aceite esencial se prepararán de acuerdo al método de precipitación descrito por Bhandari (1998) y Ayala-Zavala y otros (2007). Una porción de  $\beta$ -ciclodextrina se disuelve en una solución etanol-agua (1:2), agitando a una temperatura de 55°C, mientras se adiciona lentamente la solución de aceite esencial disuelto en etanol (10 % peso/volumen). La solución se almacenó a 4°C por 24 h. El complejo precipitado ( $\beta$ -ciclodextrina+ aceite esencial) se separó por filtración y secado por convección a 60°C.

### Preparación del cultivo

Ochenta gramos de papa blanca fueron pelados, cortados y depositados en un recipiente conteniendo 250 mL de agua destilada. El sistema papa + agua destilada fue llevado a ebullición por 10 min. Posteriormente, la mezcla fue filtrada y la solución resultante fue completada hasta 250 mL, con agua destilada. La solución resultante fue mezclada con 2.5 g de Agar y 2.5 g de sacarosa. Esta solución fue esterilizada a 120 °C x 15 min. Paralelamente fue preparado 100 mL de una solución de Oxitetraciclina al 0.1%. Se mezcló ambas soluciones 250 mL + 30 mL de solución oxitetraciclina, para obtener el Medio Agar Papa Oxitetraciclina (APOX). Diez mililitros de APOX fueron depositados en placas petri para el cultivo de los mohos y levaduras.

Para el experimento se usó un cultivo puro de levadura blanca, también se aisló hongos de tomates haciendo uso de la solución salina

peptonada (SSP), se usó 90 ml de SSP y se agregó 10 g de cáscara de tomate.

La actividad antibacteriana se determinó por dos métodos. El primer método fue el de difusión en agar descrito por Martínez J. (2003), en la cual se hace un agujero cuadrado de 1 cm<sup>2</sup> en el agar y posteriormente se coloca en el agujero la cantidad de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) puro o encapsulado B- ciclodextrina. El segundo método consistió en la modificación de difusión en agar, que consta en la colocación de un soporte el cual fue el papel filtro de un diámetro conocido (2 cm) con las cantidades de aceite esencial (tanto encapsulado como puro) sobre el agar después de hacer el respectivo sembrío microbiano.

En los dos métodos usados, se empleó la misma concentración de aceite tanto encapsulado como puro, la cantidad usada de aceite esencial de orégano fue de 0.025 g.

El sembrado de microorganismos se realizó mediante el esquema, mostrado en la figura 2.

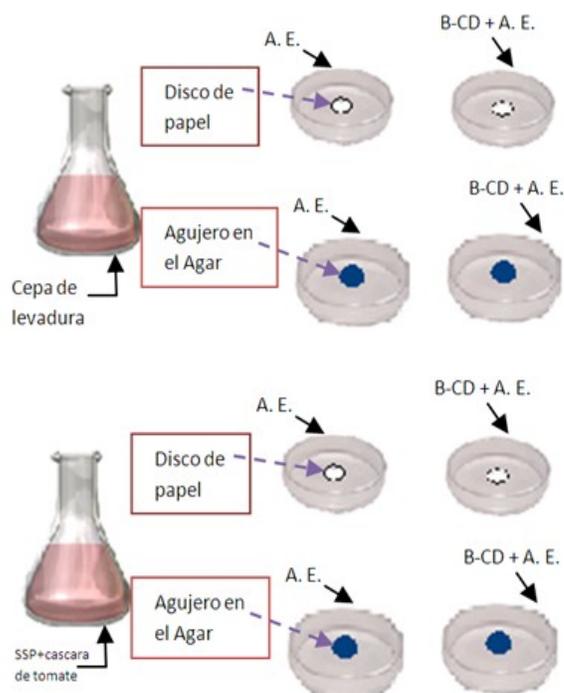


Figura 2 - Esquema del proceso de sembrado de microorganismos

## Resultados y Discusión

El aceite esencial de orégano extraído por hidrodestilación, tuvo un rendimiento de 1.2 % + 0.5.

### Encapsulamiento del aceite esencial

Se realizaron dos experimentos de encapsulamiento de aceite esencial de orégano en  $\beta$ -ciclodextrina, para ambos se usó la misma metodología descrita anteriormente, la variación fue en la cantidad de  $\beta$ -ciclodextrina y aceite esencial: En el primero se usó 50 g de  $\beta$ -ciclodextrina y 5 g de aceite esencial de orégano, pasada las 24 horas, se pudo observar la desaparición de las gotículas de aceite en la superficie del líquido, suponiendo la encapsulación de todo el aceite presente en el medio.

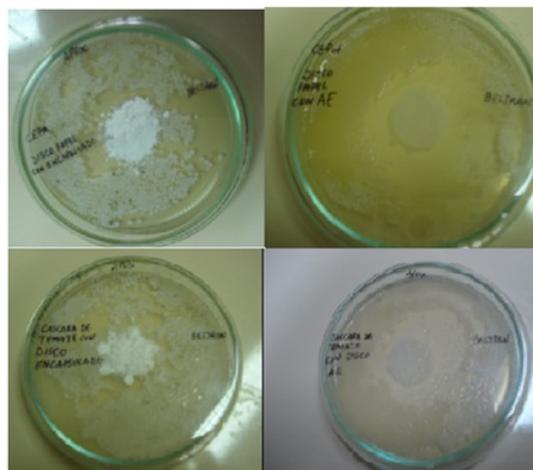
En el segundo experimento se usó 25 g de  $\beta$ -ciclodextrina y 7.5 g de aceite esencial de orégano, antes de la separación del líquido del precipitado se pudo observar la presencia de gotículas de aceite presentes en la superficie del líquido, entonces se puede decir que no todo el aceite esencial fue encapsulado ya que el medio se encontraba saturado.

La cantidad del aceite esencial encapsulado fue de 0.2489 g en cada 1 g de  $\beta$ -ciclodextrina. Siendo que el medio contenía una humedad relativa mayor al 88%, las microcapsulas de  $\beta$ -ciclodextrina ganaron rápidamente humedad no dando tiempo para la liberación del aceite esencial de orégano, cabe resaltar que la liberación del aceite esencial es paulatinamente.

### Capacidad antimicótica del aceite esencial

El poder antimicótico del aceite esencial de orégano es evidenciado mediante la inhibición de los mohos y levaduras aisladas de la cascara de tomate y el cultivo puro de levaduras blancas. El halo inhibitorio tanto para la cepa de levadura y los mohos y levaduras de tomate fueron similares (Figura 3).

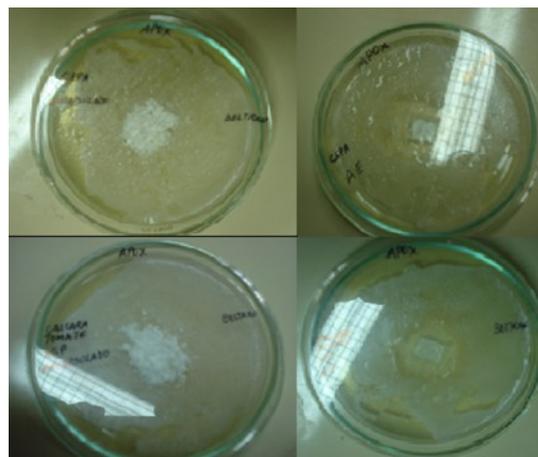
Se pudo notar una gran diferencia en los resultados en relación al método usado, cabe



**Figura 3 – Resultado microbiológico, con el método de difusión usando como soporte un papel filtro.**

resaltar que en los diferentes métodos se usó 0.025 g de aceite esencial tanto encapsulado como puro.

El método en el cual se usó como soporte un papel filtro con un diámetro de 2 cm en el se colocó el aceite puro, se obtuvo un halo de 1.7 cm y para la  $\beta$ -ciclodextrina 0.8 cm (Figura 4).



**Figura 4 – Resultado microbiológico con el método de difusión en agar**

El método de difusión en agar obtuvo un halo promedio de 1.3 cm y para el aceite esencial encapsulado en  $\beta$ -ciclodextrina no se obtuvo ningún halo inhibitorio, esto se debe a la rápida ganancia de humedad de la  $\beta$ -ciclodextrina

impidiendo la liberación del aceite esencial.

Los resultados de esta investigación corroboraron al estudio de Carmo y otros (2008), mencionan que el aceite esencial de orégano inhibió el crecimiento de mohos y levaduras presentes en alimentos. Daferera y otros (2000) declaran que el aceite esencial de orégano inhibió totalmente el crecimiento de *penicilium digitatum*, entre otros mohos.

### Conclusiones

El rendimiento del aceite esencial de orégano es de  $1.2 \pm 0.5$  %.

El mejor método usado para inhibición de microorganismos fue el método difusión en agar con uso de un soporte (papel filtro de 2 cm de diámetro).

El aceite esencial puro tiene un mayor halo inhibitorio que el aceite encapsulado en  $\beta$ -ciclodextrina.

El aceite esencial de orégano tuvo una acción antimicrobiana en las cepas de levadura blanca y en los mohos y levaduras aislada de la cascara de tomate.

### Referencias

Albado E, Saez G, Grabel S. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Rev Med Hered 12 (1), 2001 (Rev Med Hered 2001; 12: 16-19).

Alzoreky NS, Nakahara K. 2002. Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. Int. J. Food Microbiol. 80, 223-230.

Ayala-Zavala JF, Villegas-Ochoa MA, González-Aguilar GA. 2007. ¿La adición de compuestos antimicrobianos naturales afecta la calidad sensorial de los frutos frescos cortados? Industria Alimentaria. Disponible en [www.alfa-editores.com/web](http://www.alfa-editores.com/web)

Bhandari BR, D'Arcy BR, Bich LLT. 1998. Lemon oil to  $\beta$ -Cyclodextrin ratio effect on the

inclusion efficiency of  $\beta$ -Cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. J. Agric. Food Chem. 46, 1494-1499.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology. 94. 223-253.

Carmo E, Lima E y Souza E. 2008. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. Braz. J. Microbiol. [serial on the Internet]. [cited 2009 Apr 13]; 39(2): 362-367. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822008000200030&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822008000200030&lng=en). doi: 10.1590/S1517-83822008000200030.

Cerpa M. 2007. Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelo y caracterización. (Tesis doctoral). Cocero M: Universidad de Valladolid, departamento de ingeniería química y tecnología del medio ambiente. P. 251.

Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. J. Agric. Food Chem. 48, 2576-2581.

Davidson PM, Naidu AS. 2000. Phyto-Phenols. In: Naidu, A.S. (Ed.), Natural Food Antimicrobial Systems. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 265-294.

Gill AO, Delaquis PJ, Russo P, Holley RA. 2002. Evaluation of antilisterial action of oregano oil on vacuum packed ham. Int. J. Food Microbiol. 73, 83-92.

Harpaz S, Glatman L, Drabkin V, Gelman A. 2003. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf-life of freshwater reared Asian sea bass (*Lateolabrax niloticus*). J. Food Protect. 66, 410-417.

Heath H. y Reineccius G. 1986. Flavor chemistry and Technology. USA: AVI publishers.

- Holley RA, Patel D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22, 273–292.
- Lemay MJ, Choquette J, Delaquis PJ, Gariépy C, Rodrigue N, Saucier L. 2002. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 217-226.
- Mangena T, Muyima NYO. 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 291-296.
- Marino M, Bersani C, Comi G. 2001. Impedance measurement to study antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 187-195.
- Martínez J. 2003. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Rev. Fac. Agron. Luz Pg.* 502- 512.
- Nielsen PV, Rios R. 2000. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and their possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 219-229.
- Parry E. 1921. *E. J. The Chemistry of Essential Oils and artificial perfumes.* 4<sup>a</sup> ed. New York, USA. Editorial: Nostrand .
- Szente L, Szejtli J. 2003. Cyclodextrins as food ingredients, *Trends in Food Science and Technology*, 15, 137-142.
- Skandamis PN, Nychas GJE. 2001. Effect of Oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmosphere. *J. Appl. Microbiol.* 91, 1011-1022.
- Vrinda Menon K, Garg SR. 2001. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microbiology* 18, 647– 650.
- Yin MC, Cheng WS. 2003. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Sci.* 63, 23-28.