



Artículo

Actividad antimicrobiana de extractos hidroetanólicos de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y cúrcuma (*Curcuma longa*)

Antimicrobial activity of ethanolic extracts of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and
turmeric (*Curcuma longa*)

Ana Silvia **Falco**^{2*}, Walter José **Martínez**¹, José Luis **Rodríguez**²,
Margarita **Núñez de Villavicencio**², Eva **Sevillano**²

¹Universidad de Córdoba. Carrera 6, N° 76-103, Montería, Departamento de Córdoba, Colombia.

²Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Carretera al Guatao, km 3 ½, La Lisa,
Ciudad de La Habana, Cuba, C. P. 19200.

*Autora para correspondencia: silviaf@iia.edu.cu

Aceptado 18-Mayo-2011

Resumen

Los extractos de plantas se han convertido en potenciales alternativas tanto para la industria de medicamentos como para la alimentaria debido a la actividad antioxidante de los compuestos naturales y al desarrollo de multirresistencia por parte de los microorganismos a los conservantes y antibióticos de uso común. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la capacidad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos de limoncillo y cúrcuma frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces sake* y *Aspergillus oryzae*. El extracto de cúrcuma presentó elevada actividad bactericida y antifúngica a concentraciones de 3,11 y 5,65 mg ácido gálico/mL extracto.

Palabras claves: capacidad antimicrobiana, extracto de limoncillo, extracto de cúrcuma.

Abstract

The plant extracts have become potential alternatives for the pharmaceutical and food industry due to the antioxidant activity of natural compounds and the development of multi-drug resistant microorganisms to antibiotics and preservatives in common use. In this study the antimicrobial activity of ethanolic extracts of lemongrass and turmeric was evaluated against the microorganisms: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces sake* and *Aspergillus oryzae*. The turmeric extract showed high antimicrobial activity at 3.11 and 5.65 mg gallic acid/mL extract.

Key words: antimicrobial activity, lemongrass extract, turmeric extract.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de multirresistencia por parte de los microorganismos a los conservantes químicos y antibióticos de uso común es un tema que ocupa un lugar preponderante desde comienzos del siglo XXI, aunque requiere aún de muchas investigaciones para lograr la obtención de nuevos productos antimicrobianos alternativos.

Por otra parte, los compuestos antioxidantes sintéticos, ampliamente utilizados en la industria de alimentos, son objeto de severas restricciones regulatorias por sus efectos nocivos sobre la salud. Desde este punto de vista, los extractos de plantas se han convertido en una potencial opción lo mismo para la industria de medicamentos como para la alimentaria, ya que gran número de plantas aromáticas producen compuestos bioactivos que podrían emplearse tanto para preservar la salud como los alimentos (Mesa *et al.*, 2000; Schuck *et al.*, 2001).

Muchos de los compuestos antioxidantes presentan además acción antimicrobiana (Skandamis *et al.*, 2001; Mimica-Dukic *et al.*, 2003; Antolinez-González *et al.*, 2008; Monroy-Vázquez *et al.*, 2009; Castaño-P. *et al.*, 2010). El limoncillo (*Cymbopogon citratus*) también conocido como limonaria, caña santa o caña de limón, es una planta utilizada en Cuba por sus múltiples usos terapéuticos (Cápiro *et al.*, 2001) con

demostrados efectos como antioxidante (Cheel *et al.*, 2005) siendo sus hojas fuente potencial de polifenoles bioactivos (Figueirinha *et al.*, 2008). La cúrcuma (*Curcuma longa*), por su parte, es una planta que produce rizomas con contenido de materia colorante (curcumina, desmetoxicurcumina y bisdesmetoxicurcumina) y aceites esenciales (turmerona, ar-turmerona, entre otros) (Barrero-M. y Carreño, 1999; Barrero y Carreño, 2000; Ravindran, 2007).

Ha sido demostrado que los extractos acuosos de cúrcuma y la fracción volátil de limoncillo presentan una excelente actividad antimicrobiana frente a *Candida albicans* (Schuck *et al.*, 2001) y ambas especies por sus potencialidades podrían emplearse en la formulación de alimentos funcionales. De acuerdo con esto, se trazó como objetivo del presente trabajo evaluar la capacidad antimicrobiana de los extractos hidroetanólicos de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces sake* y *Aspergillus oryzae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima y preparación de las muestras

La recolección de las hojas de limoncillo y los rizomas de cúrcuma se realizó en los campos de la cadena de plantas aromáti-

aromáticas de la ciudad de Montería (Colombia). Se llevó a cabo en los meses de Septiembre a Diciembre del año 2010. Las muestras fueron secadas a 50 ± 1 °C en estufa de convección forzada marca Memmert, modelo TU 15. Las muestras se molieron empleando un molino de alta velocidad GRINDOMIX GM 200 de cuchillas (Retsch® GmbH, Haan, Alemania) y se pasaron por una malla con un diámetro de orificio de 0,5 mm. Las muestras secas y molidas se envasaron en bolsas de polipropileno y luego fueron almacenadas en desecadora. Los ensayos físicos, químicos y microbiológicos se realizaron en el Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia en La Habana, Cuba.

Extracción de los compuestos fenólicos

Los extractos fueron preparados en tubos de centrífuga con tapas de rosca. Se pesó $1,0 \pm 0,1$ g de las muestras molidas y secas a las que se añadieron 20 mL de una mezcla de etanol/agua (50/50). Se agitó la mezcla a 1500 rpm durante 1 h y luego se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos en una centrífuga MLW, modelo T-62 (Leipzig, Alemania). Los extractos obtenidos se conservaron a temperatura de -18 °C en un freezer marca Frigidaire®, modelo FFC0723DW9. Para la extracción de los compuestos fenólicos de limoncillo y cúrcuma se emplearon soluciones hidroetanólicas a 50 y 75 % v/v, respectivamente.

El contenido de fenoles, se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Slinkard y Singleton (1977), empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu. A una alícuota de 50 µL del extracto, se le adicionaron 2500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido (1:10), pasados cinco minutos se añadieron 2000 µL de solución al 7,5 % de carbonato de sodio. La mezcla se dejó en reposo por 2 h. La absorbancia se midió a 765 nm en un espectro-

fotómetro UV-Vis SHIMADZU, modelo UV 240 1PC (SHIMADZU Corporation, Kyoto, Japón). Se empleó ácido gálico como referencia para la curva de calibración. El contenido total de fenoles fue expresado como mg de ácido gálico/L de extracto.

Posteriormente, el contenido alcohólico de los extractos se eliminó a temperatura de 40 °C y en vacío para que no interfiriera en el crecimiento microbiano. Se prepararon las diluciones en base al contenido de fenoles: 0; 0,75; 1,55; 3,11 y 5,65 mg ácido gálico /mL extracto.

Determinación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los extractos de limoncillo y cúrcuma fue evaluada por el método de contacto en tubos según el procedimiento establecido para medir la eficacia de sustancias desinfectantes o antibióticas (Collins, 1969). Luego se procedió al recuento en placa de los sobrevivientes. En el estudio se emplearon los siguientes microorganismos:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
- *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- *Saccharomyces sake* (IIIA 21501)
- *Aspergillus oryzae* (IIIA 2214)

Las 2 primeras cepas procedentes de la colección del Instituto de Ingeniería Genética y Biotecnología y las otras 2, del banco de cepas del Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, ambas Instituciones de Cuba.

Para el test de contacto, se tomaron 4 mL de cada extracto: 0,75; 1,55; 3,11 y 5,65 mg ácido gálico/mL extracto y se pasaron a tubos estériles; a cada uno se les adicionó 1 mL de la suspensión microbiana en suero fisiológico, que se preparó a partir de los cultivos en fase de crecimiento logarítmica. La concentración bacteriana se midió por la escala de McFarland y la de *Saccharomyces sake* mediante la cámara

de Newbauer. Posteriormente, se dejó en contacto al microorganismo con el extracto, por 30 minutos y luego por 24 h. Se utilizó agua estéril como control. Transcurrido el tiempo de ensayo, se procedió a la siembra en profundidad de 0,5 mL del extracto inoculado y se emplearon para la recuperación de los microorganismos los medios de cultivo Agar Triptona Soya (ATS) para bacterias y Agar Extracto de Malta (AEM) para la levadura. Las placas inoculadas se incubaron a 35 °C para *S. aureus* y *E. coli*, y a 25 °C para *Saccharomyces sake*. Luego se contaron los sobrevivientes.

El hongo *Aspergillus oryzae* no mostró buen comportamiento por la técnica de contacto y recuento, por lo que se sembró una porción de 5 mm de micelio en el centro de placas de Petri con AEM + extracto. Las placas se incubaron a 30 °C y luego se midió el diámetro de la colonia a los 7 y 15 días.

Análisis estadístico

A los resultados obtenidos en el conteo de sobrevivientes en 3 repeticiones de la experiencia con cada extracto se les calculó la media y se elaboraron gráficos de log del conteo de microorganismos vs. concentración de fenoles expresados como mg de ácido gálico por mL de extracto utilizando el software Microsoft® Office Excel, versión 2003 (Microsoft® Corporation, Redmond, WA, USA). Los datos del crecimiento del hongo se determinaron según el diámetro de la colonia en mm, se promediaron y se les calculó la desviación estándar para representar los valores en un cuadro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tiempo de contacto de 30 minutos

En las Figs. 1 y 2, se representa el comportamiento de *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Saccharomyces sake* frente a los extractos de limoncillo y cúrcuma a diferentes

concentraciones y con un tiempo de contacto de 30 minutos.

Se puede apreciar en la Fig. 1 que el extracto de limoncillo no presentó actividad antimicrobiana a las concentraciones estudiadas contra ninguno de los microorganismos. Por el contrario, el extracto de cúrcuma tuvo un marcado efecto después de 30 minutos de contacto. Según los resultados obtenidos, para *E. coli* la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto de cúrcuma resultó ser de 1,55 mg ácido gálico/mL de extracto y para *Staphylococcus aureus* 0,75 mg ácido gálico/mL de extracto. Como se observa, a concentraciones más elevadas no se produjo crecimiento. Para *Saccharomyces sake*, las concentraciones de 3,11 y 5,65 mg ácido gálico/mL de extracto de cúrcuma, provocaron un decrecimiento de la población viable aproximadamente de 3 ciclos logarítmicos, poniéndose de manifiesto las propiedades fungistáticas del extracto.

Tiempo de contacto de 24 horas

En las Figs. 3 y 4 se observa, que para un tiempo de contacto de 24 horas, el comportamiento de los microorganismos fue similar al que se obtuvo con 30 minutos, excepto para *Staphylococcus aureus* que mostró un decrecimiento de 2 órdenes logarítmicos.

De forma general, en las Figs. 1, 2, 3 y 4 se aprecian los grados de sensibilidad de los microorganismos estudiados frente a las diferentes concentraciones de los extractos. De tal manera *Staphylococcus aureus* y *E. coli* fueron los microorganismos más sensibles al extracto de cúrcuma y se demostró la acción bactericida del mismo.

Para *Saccharomyces sake* también el extracto de cúrcuma ejerció una acción inhibitoria en todas las concentraciones y los dos tiempos estudiados, aunque sin lograr eliminar todas las células viables. Por tanto, su sensibilidad fue mucho menor y el extracto mostró una acción fungistática.

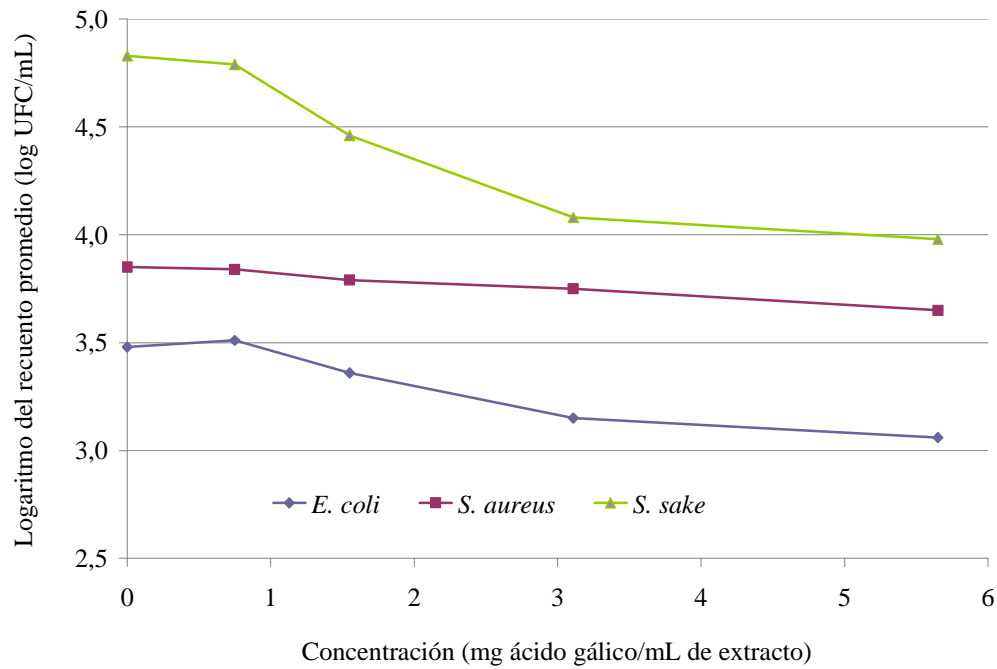


Figura 1.- Comportamiento de los microorganismos frente a los extractos de limoncillo y 30 min de contacto.

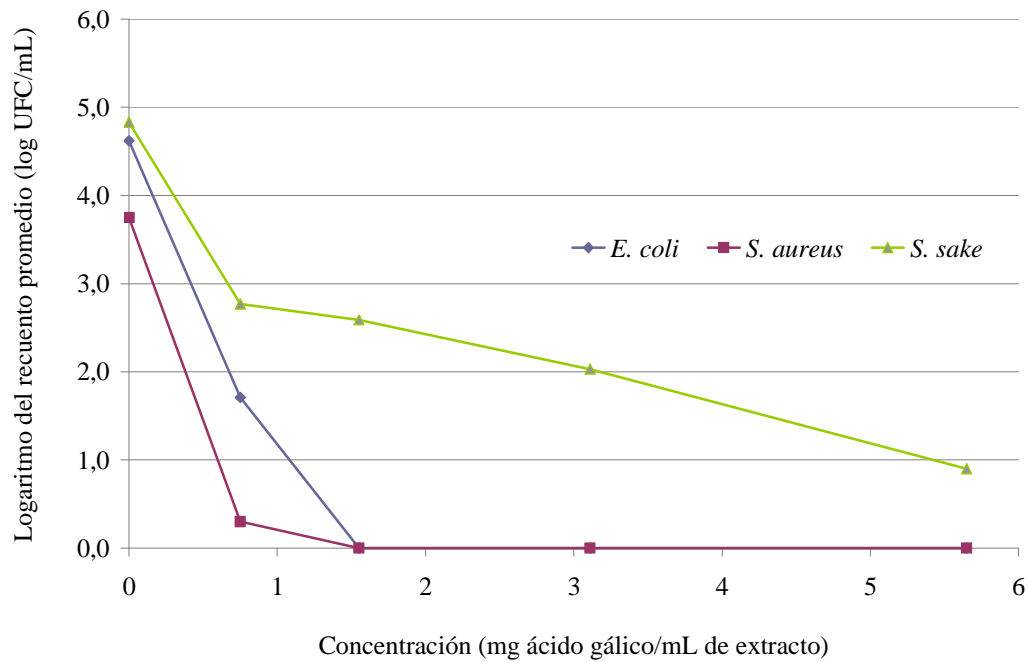


Figura 2.- Comportamiento de los microorganismos frente a los extractos de cúrcuma y 30 min de contacto.

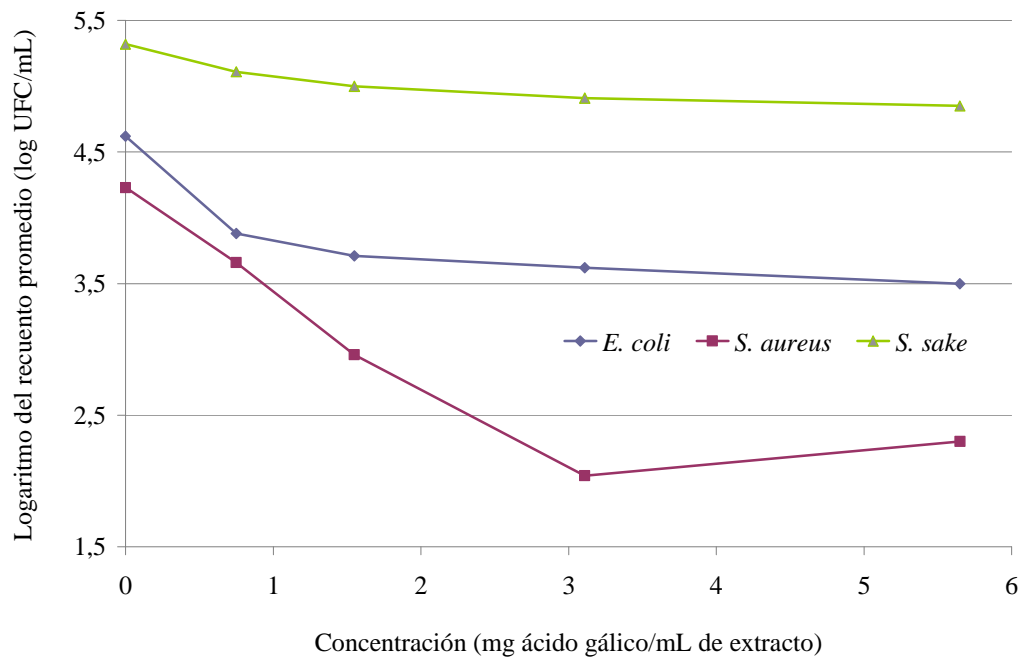


Figura 3.- Comportamiento de los microorganismos frente a los extractos de limoncillo y 24 h de contacto.

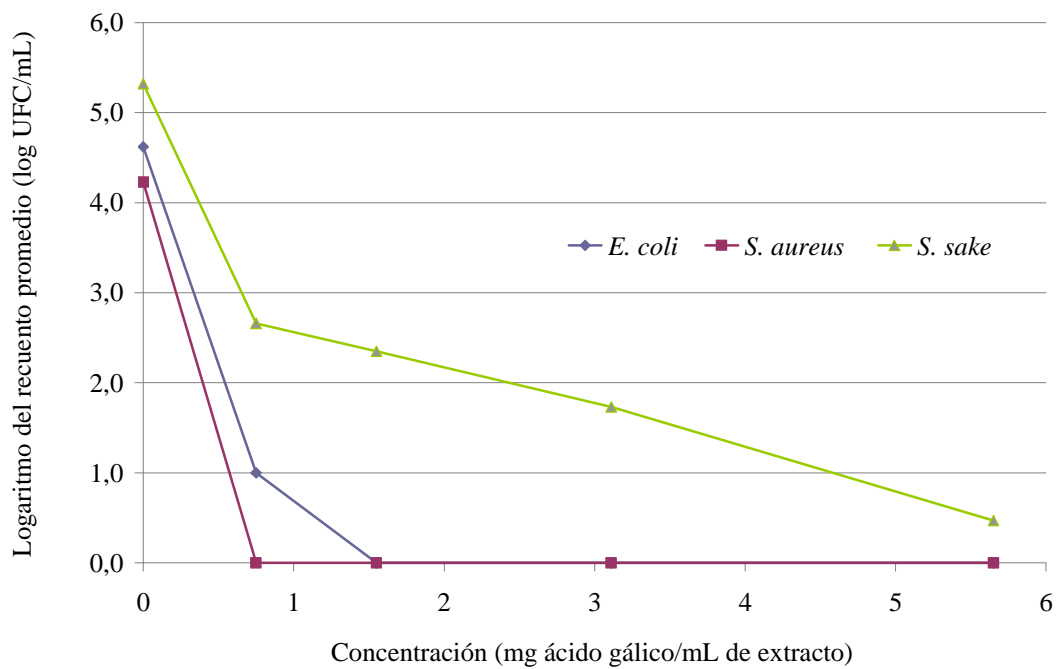


Figura 4.- Comportamiento de los microorganismos frente a los extractos de cúrcuma y 24 h de contacto.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo referidos por Schuck *et al.* (2001) quienes determinaron que los extractos acuosos de limoncillo presentan solo muy ligera actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *E. coli*.

Aspergillus oryzae

Los resultados obtenidos para *Aspergillus oryzae* se muestran en el Cuadro 1. Como puede verse, *Aspergillus oryzae* manifes-

tó una marcada sensibilidad al extracto de cúrcuma. Se observó que luego de 7 y 15 días el diámetro de la colonia en el medio AEM + agua (control) aumentó considerablemente y en el que se añadió limoncillo ocurrió exactamente igual; sin embargo, no presentó crecimiento luego de 15 días en el medio con extracto de cúrcuma a la concentración de 5,65 mg ácido gálico/mL. En las placas con la concentración de 3,11 mg ácido gálico/mL, tampoco se evidenció crecimiento de la colonia pues solo alcanzó el valor de 8,2 mm.

Cuadro 1.- Comportamiento de *Aspergillus oryzae*, frente a los extractos de cúrcuma y limoncillo a diferentes concentraciones.

Extractos	Concentración (mg ácido gálico/mL)	Diámetro (mm)		
		0 días	7 días	15 días
Control	0	4,0 (1,02)	30 (2,72)	48 (2,86)
Limoncillo	3,11	5,0 (0,97)	32 (2,55)	42 (2,81)
Cúrcuma	5,65	5,0 (1,00)	5 (1,04)	5 (1,01)
Cúrcuma	3,11	4,5 (1,03)	8 (1,53)	8,2 (1,43)
Cúrcuma	1,55	5,0 (0,99)	17 (2,05)	19 (2,07)

$n = 3$.

Media (desviación estándar).

Por otra parte, se comprobó mediante observaciones directas con un estereoscopio Nacet, modelo NS 30, que todas las concentraciones del extracto de cúrcuma estudiadas produjeron un retardo en la maduración de las esporas del hongo. Se observó que pasados 15 días, los cuerpos de fructificación de *Aspergillus oryzae* se mantuvieron de color blanco y las esporas no

habían madurado, mientras que con el agua o el extracto de limoncillo, las esporas maduraron y cayeron al medio lo que originó un profuso crecimiento (Fig. 5). Este comportamiento se atribuye a la presencia de compuestos curcuminoides, entre ellos curcumina (diferuloilmetano), demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina (Péret de Almeida, 2006; Ravindran *et al.* 2007).

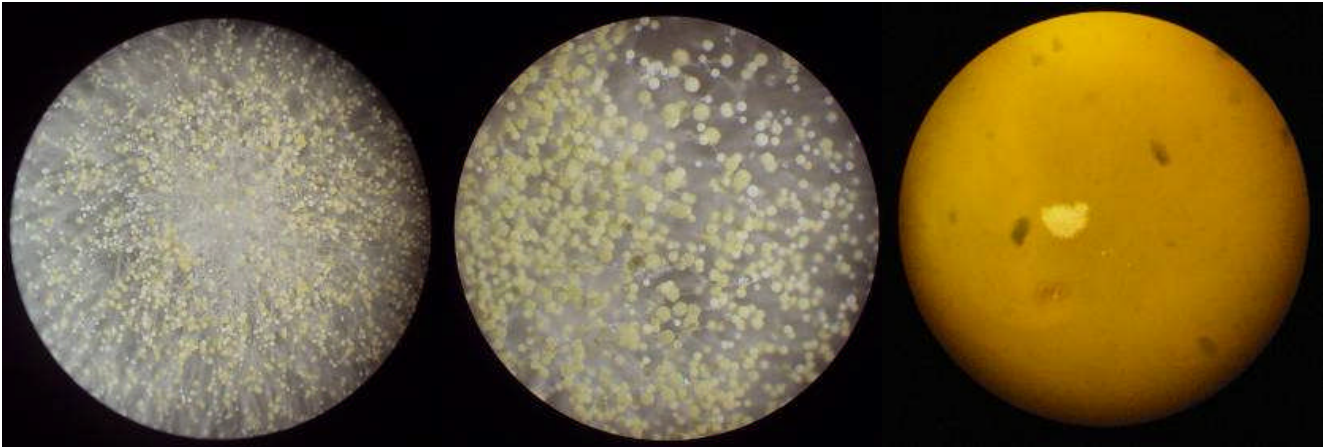


Figura 5.- Crecimiento de *Aspergillus oryzae*. A: control (agua), B: 3,11 mg ácido gálico/mL de extracto de limoncillo, C: 3,11 mg ácido gálico/mL de extracto de cúrcuma.

CONCLUSIONES

- El extracto de cúrcuma en todas sus concentraciones y tiempos de contacto tuvo una marcada actividad antimicrobiana. La Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de cúrcuma para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fue de 1,55 y 0,75 mg ácido gálico/mL de extracto, respectivamente.
- Para *Saccharomyces sake* los extractos de cúrcuma presentaron actividad fungistática.
- Los extractos hidroalcohólicos de limoncillo no presentaron actividad frente a los microorganismos.
- *Aspergillus oryzae* se inhibió con la concentración de 5,65 y 3,11 mg ácido gálico/mL de extracto de cúrcuma y ocurrió un retardo en la maduración de los cuerpos de fructificación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antolinez-González, Juan Carlos; de Colmenares, Nélica G.; Usubillaga,

Alfredo; Darghan, Enrique y Linares, Sonia. 2008. Evaluación de variables agronómicas en el cultivo de limonaria (*Cymbopogon citratus* Stapf) para la producción de aceite esencial. *Interciencia*. 33(9):699.

Barrero, Marinela y Carreño, Rafael J. 2000. Evaluación de los aceites esenciales de la cúrcuma cultivada en Venezuela. *Agronomía Tropical*. 50(1):67-81.

Barrero-M., Marinela y Carreño, Rafael J. 1999. Evaluación histoquímica de los rizomas de cúrcuma cultivada en Venezuela. *Agronomía Tropical*. 49(3):349-359.

Cápiro, Nancy; Sánchez-Lamar, Ángel; Fonseca, Gladys; Baluja, Ligia y Borges, Ernesto. 2001. Capacidad protectora de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, ante el daño genético inducido por estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 20(1):33-38.

Castaño-P., Hader I.; Ciro-G., Gelmy; Zapata-M., José E. y Jiménez-R., Silvia L. 2010. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae*,

- Revista de la Facultad de Química Farmacéutica (Universidad de Antioquia, Colombia). 17(2):149-154.
- Cheel, José; Theoduloz, Cristina; Rodríguez, Jaime and Schmeda-Hirschmann, Guillermo. 2005. Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(7):2511-2517.
- Collins, C.H. 1969. Métodos microbiológicos. Zaragoza, España: Editorial Acribia. pp. 371-380.
- Figueirinha, Artur; Paranhos, António; Pérez-Alonso, José J.; Santos-Buelga, Celestino and Batista, Maria T. 2008. *Cymbopogon citratus* leaves: characterisation of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chemistry*. 110(3):718-728.
- Mesa, M.D.; Ramírez-Tortosa, M.C.; Aguilera, C.M.; Ramírez-Boscá A. y Gil, A. 2000. Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los curcuminoides. *Ars Pharmaceutica*. 41(3):307-321.
- Mimica-Dukic, Neda; Bozin, Biljana; Sokovic, Marina; Mihajlovic, Biserka; Matavulj, Milan. 2003. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Medica*. 69(5):413-419.
- Monroy-Vázquez, Agustín; García-Martínez, Ignacio y Totosaus, Alfonso. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos etanólicos de romero y chile ancho y su aplicación en un batido cárnico. *Nacameh*. 3(1):21-32.
- Péret de Almeida, Lúcia. 2006. Caracterização de pigmentos da *Curcuma longa* L., avaliação da atividade antimicrobiana, morfogênese *in vitro* na produção de curcuminóides e óleos essenciais. Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil.
- Ravindran, P.N. 2007. Turmeric-The Golden spice of life. In *Turmeric. The genus Curcuma*. (pp. 2). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Ravindran, P.N.; Nirmal-Babu, K. and Sivaraman, K. 2007. *Turmeric. The genus Curcuma*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. pp. 47-453.
- Schuck, Virna J.A.; Fratini, Marisa; Rauber, Cristiane S.; Henriques, Amélia e Schapoval, Elfrides E.S. 2001. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 37(1):45-49.
- Skandamis, P.; Koutsoumanis, K.; Fasseas, K. and Nychas, G.J.E. 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science*. 13(1):65-75.
- Slinkard, Karen and Singleton, Vernon L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28(1):49-55.