



Comunicación

## **Efecto antimicrobiano de extractos etanólicos de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus***

Antimicrobial effect of ethanolic extracts from basil (*Ocimum basilicum* L.)  
on growth of *Staphylococcus aureus*

Julio Colivet<sup>1\*</sup>, Glenny Marcano<sup>1</sup>, Genette Belloso<sup>1</sup>, Diagnora Brito<sup>2</sup>, Ely Gómez<sup>2</sup>

Universidad de Oriente, Núcleo Monagas, Escuela de Zootecnia, <sup>1</sup>Departamento de Tecnología de Alimentos y <sup>2</sup>Departamento de Biología y Sanidad Animal. Maturín, C. P. 6201, Estado Monagas, Venezuela

\*Autor para correspondencia: juliocolivet@gmail.com

Aceptado 03-Enero-2012

### **Resumen**

La albahaca (*Ocimum basilicum* L.) es una planta herbácea de la familia de las labiadas (Lamiaceae), muy común en Venezuela. En la presente investigación se evaluó la supervivencia de una cepa de *Staphylococcus aureus* por la acción antimicrobiana de extractos etanólicos de albahaca fresca y seca. Las muestras frescas fueron sometidas a homogeneización en licuadora. Para la obtención de las muestras secas se utilizó una estufa convencional a temperatura de 55 °C x 28 horas. Los extractos se obtuvieron por destilación a presión reducida, temperatura de 45 °C y empleando etanol como solvente. Posteriormente, se emplearon en medios de cultivo contentivos de *S. aureus* y se monitoreó el crecimiento del microorganismo en el tiempo, obteniéndose los parámetros de crecimiento a través del modelo de Baranyi y Roberts (1994). Los extractos frescos y secos produjeron efecto antimicrobiano sobre *S. aureus* a concentraciones de 5 y 10 %, afectando los parámetros de crecimiento de la bacteria, presentando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control.

**Palabras claves:** albahaca, efecto antimicrobiano, *Ocimum basilicum* L., *S. aureus*, supervivencia.

### Abstract

Basil (*Ocimum basilicum* L.) is a herbaceous plant of the Labiatae family (Lamiaceae), common in Venezuela. In the present study, the survival of a *Staphylococcus aureus* strain by the antimicrobial action of ethanolic extracts from fresh and dehydrated basil was evaluated. Fresh samples were subjected to homogenization in a blender. To obtain dehydrated samples a conventional oven was used (55 °C x 28 hours). The extracts were obtained by distillation under reduced pressure, temperature 45 °C, using ethanol as a solvent. Subsequently were used in culture media containing *S. aureus* and the growth of the microorganism over time was monitored. Growth parameters were obtained through the Baranyi and Roberts (1994) model. The extracts produced antimicrobial effect on *S. aureus* at concentrations of 5 and 10 %, affecting the growth parameters of the bacteria and showing statistically significant differences ( $p < 0,05$ ) in comparison to control.

**Key words:** antimicrobial effect, basil, *Ocimum basilicum* L., *Staphylococcus aureus*, survival.

### INTRODUCCIÓN

El potencial antimicrobiano y antioxidante de extractos y aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales, con el fin de utilizarlos en el control de patógenos causantes de enfermedades en humanos, animales y vegetales, así como conservantes en alimentos con ventajas sobre los aditivos sintéticos, referente a efectos tóxicos y genotóxicos colaterales, favorables económica y medioambientalmente, se ha convertido en la razón de ser de muchas investigaciones recientes (Fernández-L. *et al.*, 2007). En este sentido, la búsqueda de sustancias con efecto antimicrobiano en fuentes no tradicionales, como las plantas superiores, es importante para mejorar la calidad de los alimentos (Acosta *et al.*, 2003).

El género *Ocimum* está representado por más de 150 especies y tiene una amplia distribución geográfica en las regiones de clima tropical y subtropical. En Venezuela se conocen 21 géneros de la familia Lamiaceae (Labiatae), con aproximadamente 80 especies distribuidas en todo el territorio nacional (Velázquez, 1997). Son un grupo importante de plantas aromáticas que contienen aceites esenciales ricos en diferentes constituyentes, tales como linalol,

geraniol, citral, alcanfor, eugenol y timol, entre otros y representan un inmenso valor para la industria de perfumería, cosméticos, alimentaria y la farmacéutica (Sánchez-Govín *et al.*, 2000). Su acción farmacológica se define como antiinflamatoria, antiséptica, antiespasmódica y analgésica. Es utilizado en medicina tradicional para tratar afecciones respiratorias, gastrointestinales y reumatismo. Tópicamente es usado en baños para tratar afecciones de la piel y se ha comprobado actividad antimicótica *in vitro* (Chalala *et al.*, 2002).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antimicrobiano de extractos etanólicos de albahaca (*Ocimum basilicum* L.), fresca y seca, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Obtención de la muestra de *Ocimum basilicum* L.

Muestras de plantas de albahaca fueron adquiridas en el Mercado Municipal de la ciudad de Maturín (Monagas, Venezuela) y transportadas al Laboratorio de Usos Múltiples del Programa de Tecnología de Alimentos, Escuela de Zootecnia de la Universidad de

Oriente. Previa selección, se desecharon todas aquellas con daños o síntomas de plagas o enfermedades y se almacenaron por un periodo corto de tiempo (2 h máximo) a temperatura de 5 °C.

### **Obtención de los extractos**

#### **Preparación del extracto de albahaca fresca**

Muestras de plantas de albahaca frescas fueron lavadas con abundante agua potable y secadas con papel absorbente. Posteriormente se tomaron 40 g de muestra y se les agregó 150 mL de solvente etanol. Se homogenizó en licuadora y se dejó en reposo a temperatura de 26 °C por 48 horas.

#### **Preparación del extracto de albahaca seca**

Los extractos de albahaca seca se obtuvieron siguiendo la técnica descrita por Márquez-Vizcaíno *et al.* (2007). Las plantas de albahaca (hojas y tallos) se lavaron con agua corriente y destilada. Se secaron e introdujeron en bolsas de papel perforadas para luego colocar en estufa por convección PDI System, modelo M120-VN (MPM Instruments s.r.l., Bernareggio, Milano, Italia) a 55 °C por 28 horas. Una vez secas se picaron en una picadora comercial (Moulinex) y el picado (pulverizado) se almacenó por 7 días aproximadamente en frascos color ámbar para su uso posterior. Se pesaron 40 g de muestra en una balanza analítica previamente calibrada y se colocaron en un beaker de 500 mL con 150 mL de etanol para diluir la muestra dejándola en reposo a 26 °C por 48 horas. Seguidamente, los extractos se filtraron a través de un embudo de filtración rápida para separar la parte vegetativa de la solución, la cual se concentró en un rotavapor BÜCHI, modelo R-210 Basic (BÜCHI Labortechnik AG, Suiza) a presión reducida, temperatura 45 °C y 200 rpm.

#### **Técnica de cultivo empleada para el efecto inhibitorio de extractos de albahaca fresca y albahaca seca**

### **Origen de la cepa e inoculación del microorganismo**

La cepa fue provista por el Cepario del Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Zootecnia de la Universidad de Oriente, Núcleo Monagas, Venezuela.

La inoculación de *S. aureus* se realizó de acuerdo a lo estipulado por Acero-Ortega *et al.* (2005), con algunas modificaciones. Inicialmente, de una concentración conocida del microorganismo ( $10^3$  UFC/mL), se tomaron alícuotas de 1 mL del cultivo y se añadieron a fiolas contentivas de 99 mL de caldo infusión cerebro-corazón (BHI, 'Brain Heart Infusion') en concentraciones de 0,5 y 10 % de los extractos de albahaca fresca y seca por separado. Posteriormente los medios de cultivo inoculados fueron sometidos a incubación en un baño de agua termostataado a temperatura de 37 °C.

### **Determinación del crecimiento de *Staphylococcus aureus***

La población de *S. aureus* se determinó siguiendo la metodología descrita por Harley y Prescott (2002). El crecimiento se midió después de inocular el microorganismo, cada 30 minutos. Para ello se realizaron diluciones seriadas utilizando como diluyente solución buffer fosfato (PBS, 'Phosphate Buffered Saline') y luego se tomaron alícuotas de las diluciones y se añadieron a placas de Petri con agar nutritivo (45 °C); se aplicó y se dejó solidificar. Posteriormente, se incubaron a 37 °C por 24 horas. Se contaron las células viables y se multiplicó por su factor de dilución.

### **Construcción de la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus***

Los datos obtenidos fueron convertidos a  $\log_{10}$  (N), donde N representa la población de *S. aureus* en un tiempo dado (UFC/mL). Se construyó una gráfica donde el eje de las abscisas se encontraba representado por el

tiempo de incubación y el eje de las ordenadas por el crecimiento microbiano en un tiempo dado.

### Análisis estadístico

El estudio fue realizado por triplicado. El conteo de colonias fue convertido a  $\log_{10}$  UFC/mL y los datos se procesaron usando el software estadístico SAS/STAT®, versión 8.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Las variables independientes fueron representadas por el efecto del secado en la obtención de los extractos, la concentración y el tiempo de incubación. Las diferencias de las medias fueron separadas a través del procedimiento de la Mínima Diferencia Significativa (MDS) con un nivel de significancia del 5 %.

El conteo de *S. aureus* fue modelado en función del tiempo usando el modelo de Baranyi y Roberts (1994). Para la construcción de la curva se usó el programa DMFit (Institute of Food Research, Norwich, UK). El modelo de Baranyi y Roberts es una ecuación diferencial de primer orden no autónomo y separable (Baranyi *et al.*, 1993). El modelo contiene cuatro parámetros: un parámetro representado por la fase lag;  $\mu$ , la tasa de crecimiento exponencial ( $\log_{10}$  UFC/mL/h);  $y_0$ , que representa la asíntota inferior de la curva de crecimiento bacteriano ( $\log_{10}$  UFC/mL); y  $y_{m\acute{a}x}$ , que representa la asíntota superior de la curva de crecimiento ( $\log_{10}$  UFC/mL). Dos parámetros adicionales (m y n) son incluidos en el modelo de Baranyi y Roberts correspondientes al desarrollo de la curva de crecimiento en las regiones de transición (de la fase lag a exponencial y de la exponencial a la estacionaria). La tasa de crecimiento exponencial obtenida de la curva fue transformada a tasa máxima de crecimiento específico,  $\mu_{m\acute{a}x}$  ( $h^{-1}$ ) por multiplicación de  $\mu$  con el  $\ln(10)$  (Barmpalia *et al.*, 2005).

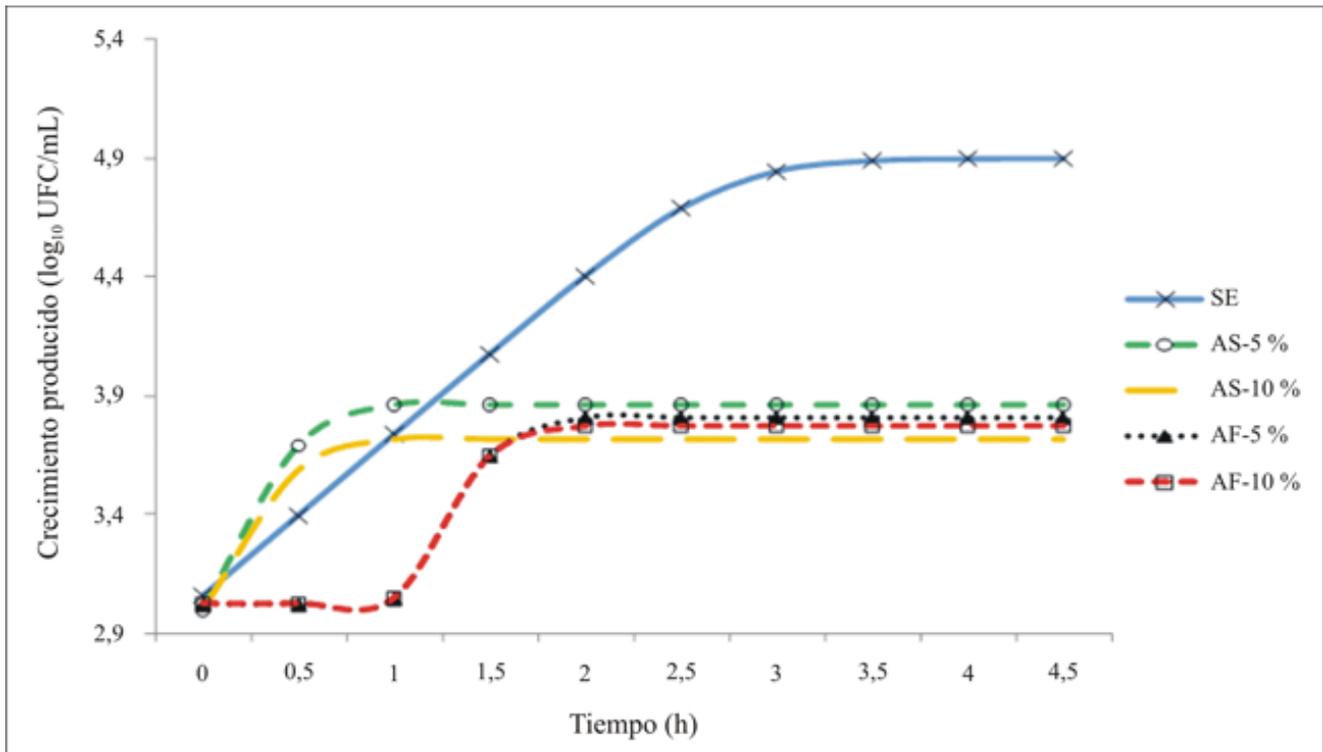
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto inhibitorio de extractos de albahaca fresca y seca sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*

Los medios de cultivo sin extracto de albahaca soportaron un rápido y prolífico crecimiento de *S. aureus*. La población del microorganismo excedió  $4,8 \log_{10}$  UFC/mL en un tiempo de 4,5 h (Fig. 1). La incorporación de extractos de albahaca fresca y seca en los medios de cultivo tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la inhibición del crecimiento de *S. aureus* ( $p \leq 0,05$ ), notándose que los extractos más efectivos fueron los que se encontraban a concentraciones del 10 %. Este comportamiento pudo deberse, según refiere la literatura, a que los extractos de albahaca poseen compuestos con propiedades antimicrobianas, principalmente debido a la presencia de altas concentraciones de linalol (Hanif *et al.*, 2011) cuyos valores pueden alcanzar 69,3 % del total de la composición química de sus aceites esenciales (Soković *et al.*, 2010).

Estos resultados fueron similares a los efectos bacteriostáticos informados por Moghaddam *et al.* (2011) para *Ocimum basilicum*, por Nwinyi *et al.* (2009) para *Ocimum gratissimum* y para *Ocimum sanctum* por Joshi *et al.* (2009) y Mishra y Mishra (2011), quienes encontraron actividad antimicrobiana de extractos y aceites esenciales de *Ocimum* sobre el crecimiento de *S. aureus*.

Aunado a esto también se estudió el efecto de los tratamientos sobre los parámetros de crecimiento derivados del modelo de Baranyi y Roberts (1994) para *S. aureus* (tiempo de latencia, tasa máxima de crecimiento y máxima densidad poblacional), notándose un efecto significativo de éstos en las variables de respuestas. El tiempo de latencia (lag) más prolongado (3,04 h) se obtuvo con la



SE: sin extracto. AS: albahaca seca. AF: albahaca fresca.

**Figura 1.-** Efecto inhibitorio de extractos de albahaca fresca y seca sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

concentración más alta de extractos de AF-10 %, diferenciándose del resto. Sin embargo, la máxima velocidad de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) se obtuvo en los extractos de AF-5 y AF-10 % con valores de 3,47 y 3,49  $\text{h}^{-1}$ , respectivamente. Mientras, la máxima densidad poblacional ( $y_{\text{máx}}$ ) fue de 5,08 en cultivos sin extractos (Cuadro 1). El comportamiento de este microorganismo ante la presencia de los extractos de albahaca fue el de prolongar el tiempo de latencia hasta la adaptación a tales condiciones, para luego compensar su crecimiento con una mayor velocidad, no obstante la máxima densidad poblacional fue alcanzada en aquellos medios sin extracto. Se resalta claramente el efecto inhibitorio de la albahaca en el crecimiento de *S. aureus*. Es de hacer notar que la pérdida de agua de las plantas provoca la volatilización o cambia las

propiedades de los compuestos químicos responsables de retrasar el tiempo de adaptación del microorganismo al medio de crecimiento.

El efecto antimicrobiano de los extractos de albahaca fue menor al obtenido por López-Pantoja *et al.* (2007), quienes en la aplicación de extractos etanólicos, acetónicos y metanólicos de semillas de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc.) a concentraciones del 10 % lograron reducir 5  $\log_{10}$  UFC/mL de la concentración inicial de *S. aureus* (8  $\log_{10}$  UFC/mL). En tal sentido, los extractos de albahaca generaron un efecto bacteriostático sobre *S. aureus*, permitiendo el crecimiento del microorganismo hasta un máximo de 3,958  $\log_{10}$  UFC/mL (AS-5 %), en contraste con aquellos donde no se aplicó extractos de albahaca al medio de

**Cuadro 1.-** Parámetros de crecimiento de *S. aureus* derivados del modelo de Baranyi y Roberts (1994).\*

Tratamiento	Lag (h)	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$y_{\text{máx}}$ ( $\log_{10}$ UFC/mL)
AS-10 %	0 <sup>a</sup>	2,803 ± 0,06 <sup>d</sup>	3,789 ± 0,03 <sup>a</sup>
AF-10 %	3,040 ± 0,15 <sup>c</sup>	3,488 ± 0,00 <sup>b</sup>	3,820 ± 0,01 <sup>a</sup>
AS-5 %	0 <sup>a</sup>	3,277 ± 0,02 <sup>c</sup>	3,958 ± 0,01 <sup>b</sup>
AF-5 %	2,078 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,470 ± 0,02 <sup>d</sup>	3,875 ± 0,04 <sup>ab</sup>
SE	0 <sup>a</sup>	1,582 ± 0,02 <sup>a</sup>	5,081 ± 0,51 <sup>c</sup>

Lag: tiempo de latencia.  $\mu_{\text{máx}}$ : tasa máxima de crecimiento.  $y_{\text{máx}}$ : máxima densidad poblacional.

SE: sin extracto. AS: albahaca seca. AF: albahaca fresca.

\* Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas.

crecimiento alcanzando valores máximos de 5,081  $\log_{10}$  UFC/mL. Los resultados obtenidos fueron similares a los informados por Park (1997), quien indicó mayor tiempo de latencia y menor densidad poblacional para *Escherichia coli* empleando extractos de *Pimenta dioica* al 2,0 %.

## CONCLUSIONES

- La incorporación de extractos de albahaca fresca y seca en los medios de cultivo representan una alternativa viable para inhibir el crecimiento de *S. aureus*.
- Los tiempos de latencia de *S. aureus* fueron mayores cuando se incorporaba extractos de albahaca fresca y estos fueron proporcionales a la concentración del extracto.
- La máxima densidad poblacional fue afectada por los extractos de albahaca, encontrándose valores menores cuando las concentraciones fueron superiores al 5 % de extracto, sin diferencias entre los extractos de albahaca fresca y seca.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias

Intermedias (MCTI) a través de la Fundación para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología en el Estado Monagas (FUNDACITE - Monagas) por haber financiado la investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acerro-Ortega, Claudia; Dorantes, Lidia; Hernández-Sánchez, Humberto; Tapia, María Soledad; Gutiérrez-López, Guastavo; Alzamora, Stella and López-Malo, Aurelio. 2005. Response surface analysis of the effects of *Capsicum* extract, temperature and pH on the growth and inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Engineering*. 67(1-2):247-252.
- Acosta, María; González, María; Araque, María; Velazco, Elsa; Khouri, Nancy; Rojas, Luis y Usubillaga, Alfredo. 2003. Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var. *basilicum*, *O. basilicum* L. var. *purpurensens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. *Revista de la Facultad de Farmacia*. 45(1):19-24.
- Baranyi, J.; Roberts, T.A. and McClure P. 1993. A non-autonomous differential

- equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*. 10(1):43-59.
- Baranyi, József and Roberts, Terry A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*. 23(3-4):277-294.
- Barmpalia, Ioanna M., Koutsoumanis, Kostantinos P.; Geornaras, Ifigenia; Belk, Keith E.; Scanga, John A.; Kendall, Patricia A.; Smith, Gary C. and Sofos, John N. 2005. Effect of antimicrobials as ingredients of pork bologna for *Listeria monocytogenes* control during storage at 4 or 10 °C. *Food Microbiology*. 22(2-3):205-211.
- Chalala, Madeline; Alfaro, Teresa; Rodríguez, Laritza.; Carballo, Caridad; Rodríguez-Ferrada, Carlos; Ramos, Raúl; Cabezas, Cristina y Reyes-Arias, Myralis. 2002. Lavado y desinfección de *Ocimum basilicum* L. var. *lactucaeifolium*. I. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 7(2):84-88.
- Fernández-L. Katherine; Viña-Patiño, Amparo; Murillo-P, Elizabeth y Méndez, Jonh Jairo. 2007. Actividad antioxidante y antimicrobial de los volátiles de cuatro variedades de albahacas cultivadas en el departamento del Tolima. *Scientia Et Technica*. XIII(33):339-341.
- Hanif, Muhammad Asif; Al-Maskari, Masoud Yahya; Al-Maskari, Awatif; Al-Shukaili, Ahmed; Al-Maskari, Ahmed Yahya and Al-Sabahi, Jamal Nasser. 2011. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of unexplored Omani basil. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(5):751-757.
- Harley, John P. and Prescott, Lansing M. 2002. *Laboratory exercises in microbiology*. (5th. Ed). The McGraw-Hill Companies. 466 p.
- Joshi, Bishnu; Lekhak, Sunil and Sharma, Anuja. 2009. Antibacterial property of different medicinal plants: *Ocimum sanctum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Xanthoxylum armatum* and *Origanum majorana*. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*. 5(I):143-150.
- López-Pantoja, Yadira; Angulo-Escalante, Miguel; Martínez-Rodríguez, Celida; Soto-Beltrán, Johana y Chaidez-Quiroz, Cristóbal. 2007. Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc.) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22. *Bioquímica*. 32(4):117-125.
- Márquez-Vizcaíno, Rita Luz; De la Rosa Torres, Catalino y Mercado-Pérez, Angelina. 2007. Actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L. Poit. (Ultimorrial). *Scientia Et Technica*. XIII(33):155-159.
- Mishra, Poonam and Mishra, Sanjay. 2011. Study of antibacterial activity of *Ocimum sanctum* extract against Gram positive and Gram negative bacteria. *American Journal of Food Technology*. 6(4)336-341.
- Moghaddam, Amir Mohammad Daneshian; Shayegh, Jalal; Mikaili, Peyman and Sharaf, Jalil Dolghari. 2011. Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(15):3453-3456.
- Nwinyi, Obinna C.; Chinedu, Nwodo S.; Ajani, Olayinka O.; Ikpo, Chinwe and Ogunniran, Kehinde O. 2009. Antibacterial effects of extracts of *Ocimum gratissimum* and *Piper guineense* on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Food Science*. 3(3):077-081.
- Park, Chan Sung. 1997. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* 196E by allspice (*Pimenta dioica* L.) during cold storage.

- Korean Journal of Society Food Science. 13(2):106-112.
- Sánchez-Govín, Ester; Leal-López, Ida María; Fuentes-Hernández, Leticia y Rodríguez-Ferrada, Carlos A. 2000. Estudio farmacognóstico de *Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca). Revista Cubana de Farmacia. 34(3):187-195.
- Soković; Marina; Glamočlija, Jasmina; Marin, Petar D.; Brkić, Dejan and van Griensven, Leo J. L. D. 2010. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. Molecules. 15(11):7532-7546.
- Velázquez, D. 1997. Clave para los géneros de Lamiaceae en Venezuela. Acta Botanica Venezuelica. 20(1):1-42.