

Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales

F. Reyes-Jurado*, E. Palou y A. López-Malo

Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla.

Ex hacienda Sta. Catarina Mártir S/N, San Andrés Cholula, Puebla. C.P.72810. México.

RESUMEN

Actualmente se sabe que los aceites esenciales derivados de plantas y especias tienen efectos antimicrobianos. Se ha identificado que estos efectos están relacionados con los componentes químicos presentes. Debido a esto, se busca estandarizar métodos que determinen el efecto antimicrobiano y los componentes químicos presentes en los aceites esenciales en fase vapor y por contacto directo. Entre los métodos más empleados para la evaluación antimicrobiana se incluyen: dilución, difusión, caja Petri invertida y cámara hermética. La técnica más utilizada para determinar y cuantificar los componentes químicos es la cromatografía; esta en conjunto con otras ha mostrado resultados repetibles. El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión bibliográfica de los métodos más empleados para determinar la composición química y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. Las técnicas revisadas presentan ventajas y desventajas, la selección de la técnica más apropiada dependerá de las características del aceite y del microorganismo objetivo.

Palabras clave: aceites esenciales, agentes antimicrobianos, composición química.

ABSTRACT

Now days are well know that essential oils derived from plants and spices have antimicrobial effects. These effects are related to the chemical components. Because of this, standardize the methods that determining the antimicrobial effect and chemical constituents of essential oils present in the vapor phase or by direct contact is a constant search. The most common methods used for the antimicrobial evaluation include: dilution, diffusion, sealed chamber and inverted Petri dish. The technique most often used to identify and quantify major components is chromatography; this method in conjunction with other techniques has shown repeatable results. The aim of this paper was to review the methods used to determine the chemical composition and the antimicrobial activity of essential oils. The techniques show advantages and disadvantages, the selection of the most appropriate technique for evaluate the antimicrobial activity depends on the characteristics of essential oil as well as the target microorganism.

Keywords: essential oils, antimicrobials agents, chemical composition.



Programa de Doctorado
en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126
Fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica:
fatima.reyesjo@udlap.mx

Introducción

La conservación de alimentos ha sido utilizada desde hace varios siglos con el fin de preservar diversos productos; hoy en día, la demanda por alimentos naturales, seguros y de buena calidad ha conducido a estudiar nuevas tecnologías, las cuales garanticen la inocuidad de los alimentos. Por un lado, las tecnologías emergentes como las altas presiones, pulsos eléctricos, o ultrasonido de baja frecuencia, están siendo estudiadas con el objetivo de inactivar microorganismos (Leistner, 2000). Por otro lado, los agentes antimicrobianos tienen como principal objetivo inhibir a los microorganismos presentes en el alimento por medio del control en los procesos naturales del deterioro de los alimentos, para poder así prevenir y controlar el crecimiento de microorganismos patógenos y aquellos causantes del deterioro (Tajkarimi, Ibrahim y Cliver, 2010).

Actualmente se sabe que los aceites esenciales derivados de plantas aromáticas y algunas especias han mostrado tener efecto antimicrobiano sobre levaduras, mohos y bacterias, con la ventaja de que su extracción, en algunos casos, no daña al medio ambiente (Adam, Dobiáš, Pavlíková y Ventura, 2009).

Por otra parte, dado que los aceites esenciales tienen un uso potencial en alimentos, especialmente en frutas y vegetales frescos, pueden llegar a convertirse en una alternativa para reducir o suplir a los agentes antimicrobianos tradicionales (Fisher y Phillips, 2008). Sin embargo, tanto los métodos de evaluación como los mecanismos por los cuales actúan no se han definido del todo (Burt, 2004; Tajkarimi *et al.*, 2010); esto repercute en su éxito al utilizarlos como agentes antimicrobianos, debido a la dificultad para comparar los resultados de diferentes investigaciones (López-Malo, Palou, Parish y Davidson, 2005).

Debido a esto, hay un esfuerzo cada vez mayor por estandarizar métodos rápidos, fiables y reproducibles que determinen el efecto que ejercen los aceites esenciales en su fase vapor y por contacto directo sobre el crecimiento microbiano. Además, nuevas técnicas para muestrear y determinar sus componentes químicos han empezado a emplearse, con lo que será posible identificar a los componentes mayoritarios y, por lo tanto, relacionarlos con la acción antimicrobiana (Rizzolo, Gerli, Prinzivalli, Buratti y Torreggiani, 2007).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica de los métodos mayormente utilizados para determinar la composición química y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.

Revisión bibliográfica

1. Aceites esenciales como antimicrobianos

Los aceites esenciales (AE) son líquidos viscosos semivolátiles, obtenidos de material vegetal como hierbas, flores, hojas, semillas, ramas, y cortezas, entre otros (Burt, 2004). Antiguamente, los AE se habían estudiado solamente desde el punto de vista aromático y como saborizantes. Sin embargo, en años recientes, los AE y sus componentes químicos han ganado un creciente interés debido a su posible uso como agentes antimicrobianos y antioxidantes (Sacchetti *et al.*, 2005).

Si bien las propiedades antimicrobianas de los AE han sido reconocidas durante años; hoy en día, debido a la gran demanda y a los cambios de legislación por alimentos seguros y de buena calidad, los AE parecen ser una alternativa natural para la conservación de alimentos (Fisher y Phillips, 2008); además de que muchos de ellos ya han sido reconocidos como seguros (GRAS) por la FDA (Tureky y Stintzing, 2013).

En la actualidad, la mayoría de los estudios han encontrado que los AE son efectivos tanto en su fase vapor como por contacto directo contra numerosas bacterias patógenas, Gram-negativas y Gram-positivas, así como contra mohos, levaduras (López, Sánchez, Batlle y Nerín, 2005) e incluso algunos mohos productores de micotoxinas (da Cruz-Cabral, Fernández-Pinto y Patriarca, 2013). En la misma línea, recientes investigaciones han reportado que dichas propiedades se deben principalmente a los compuestos químicos presentes en los AE, siendo los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos los posibles responsables de las propiedades aromáticas, antioxidantes y antimicrobianas de los AE (Kalemba y Kunicka, 2003).

Considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es muy probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible a uno específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintas partes de la célula microbiana.

Es por esto, que diversos investigadores mencionan que la actividad antimicrobiana depende principalmente de tres características: el carácter hidrófilo o hidrófobo del AE, los componentes químicos presentes y el tipo de microorganismo al que debe atacar (Kalemba y Kunicka, 2003; Holley y Patel, 2005; Fisher y Phillips, 2008; Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 2012). El carácter del AE podría indicar si este tiene la capacidad de alterar y penetrar en la estructura lipídica de la membrana celular del microorganismo, lo que conduce a la desnaturización de las proteínas y a la destrucción de la membrana celular, haciéndola más permeable, terminando en ruptura o fuga del material del citoplasma, lisis celular y por ende, en

la muerte del microorganismo. Respecto a los componentes químicos presentes, estos pueden actuar como agentes que interfieren con la translocación de protones y la fosforilación del ATP (Holley y Patel, 2005; Fisher y Phillips, 2008). Conforme al tipo de microorganismo que debe atacar, Tajkarimi *et al.* (2010) mencionan que las bacterias Gram-negativas son generalmente menos sensibles a los AE debido a los lipopolisacáridos presentes en su membrana externa, lo que restringe la difusión de compuestos hidrófobos; no obstante, esto no significa que las bacterias Gram-positivas sean siempre más susceptibles. Fisher y Phillips (2008) afirman que en las bacterias Gram-negativas sólo hay un retardo del efecto, por lo que para alcanzar el mismo efecto letal en ambos tipos de bacterias se requeriría de un mayor tiempo de exposición a los AE.

Como se mencionó anteriormente, existe una relación directa entre los componentes químicos presentes y la efectividad de los AE. Esto supone que la presencia de un componente mayoritario de un AE, tanto en una atmósfera controlada como en un alimento, es la principal responsable de la acción antimicrobiana del AE.

2. Métodos utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana

Ni los mecanismos de acción ni los métodos para determinar la actividad antimicrobiana que tienen los AE se han definido del todo. En consecuencia, existen diferentes métodos que incluyen las determinaciones de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), la eficacia antimicrobiana y la evaluación de espectro antimicrobiano, entre otros. La tabla I muestra estudios realizados con los métodos más utilizados en los últimos años, a fin de determinar las CMI y, por lo tanto, la actividad antimicrobiana de los AE.

La mayoría de los métodos *in vitro* consisten en añadir un volumen conocido del AE diluido (principalmente en etanol o metanol) o no, directamente en un tubo o caja Petri que contenga el medio adecuado para el microorganismo en prueba, o bien tener el medio estéril y después inocular el microorganismo de interés (López *et al.*, 2005).

El problema de utilizar un método u otro es la dificultad para comparar los resultados de diferentes investigaciones, lo cual, a menudo hace difícil determinar el éxito potencial de los AE como agentes antimicrobianos en un alimento (López-Malo *et al.*, 2005). Debido a la insolubilidad en agua y volatilidad de los AE, su evaluación es compleja, ya que sus propiedades pueden reducir la capacidad de dilución o causar separación de fases en los medios en los que se requiere evaluar. Además, períodos muy largos de incubación pueden dar lugar a la eva-

poración o descomposición de algunos de los componentes químicos presentes en el AE durante su evaluación (Kalemba y Kunicka, 2003). Por otra parte, la efectividad de cada método puede ser afectada por diferentes factores tales como el origen del AE, el volumen del inóculo, la fase de crecimiento del microorganismo, el medio de cultivo utilizado, el tiempo de incubación, la temperatura, el pH y la actividad de agua del medio, entre muchos otros factores (Burt, 2004).

A continuación se describen los métodos mayormente utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana de los AE, por medio de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), tanto en fase vapor como por contacto directo. La CMI se define como la menor concentración requerida del AE que tenga la capacidad de frenar el crecimiento del microorganismo (propiedades bacteriostáticas o fungísticas) (Smith-Palmer, Stewart y Fyfe, 1998) o la concentración mínima letal que asegure la reducción de un 99.9% de la población del microorganismo (propiedades bactericidas o fungicidas) (Burt, 2004). Además, la actividad de los aceites esenciales contra mohos también puede ser evaluada por el control en la inhibición de la esporulación o la producción de toxinas (Kalemba y Kunicka, 2003).

2.1. Contacto directo

Los métodos de evaluación de los AE mediante el contacto directo han sido probablemente los más utilizados en los diversos estudios, ya que se busca remplazar a los conservadores sintéticos; los cuales son añadidos durante la formulación de un alimento, de tal manera que los aceites esenciales se evalúan al añadirlos directamente en forma líquida, ya sea en un producto alimenticio o un medio sintético.

2.1.1. Dilución en agar

El método de dilución en agar es utilizado generalmente para determinar si el AE es letal contra un microorganismo, además se usa con microorganismos aeróbicos o microaerófilos con una velocidad variable de crecimiento. Para esta técnica, se preparan diferentes diluciones de los AE; posteriormente, las diluciones se añaden a los agares y estos son puestos en cajas Petri para su solidificación. Finalmente, los microorganismos en prueba previamente diluidos son inoculados en los agares e incubados a su temperatura y tiempo óptimos (de 16-24 h).

Para esta técnica, la CMI es considerada como la menor concentración que inhibía el crecimiento visible. Entre las principales ventajas se incluyen la posibilidad de evaluar muchos microorganismos a la vez, la facilidad para detectar contaminación y el hecho de que el agar puede contener mate-

Tabla I. Estudios de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales realizados con los diferentes métodos

Método utilizado	Aceite esencial	Nombre científico	Microorganismo	CMI	Referencia
Difusión en agar	Orégano	<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	79.25 µg/mL	
		<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	58 µg/mL	
		<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Escherichia coli</i>	79.25 µg/mL	Bendahou et al., 2008
			<i>Salmonella</i>	64.25 µg/mL	
		<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Thyphimurium</i>	52.25 µg/mL	
	Eucalipto blanco	<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	4.5 mg/mL	
		<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i>	2.25mg/mL	Tyagi y Malik, 2011
Difusión en agar	Canela de cassia	<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	0.05 % p/v	Oussalah et al., 2006
	Mejorana	<i>Origanum majorana</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	0.4 % p/v	
Difusión en seriada	Canela	<i>Cinnamomun osmophloeum</i>	<i>Samonella sp</i>	500 µg/mL	
		<i>Cinnamomun osmophloeum</i>	<i>Escherichia coli</i>	250 µg/mL	Chang et al., 2001
		<i>Cinnamomun osmophloeum</i>	<i>Staphylococcus aureaus</i>	250 µg/mL	
Microdilución seriada	Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureaus</i>	0.03 % v/v	Hammer et al., 1999
		<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Escherichia coli</i>	0.03 % v/v	
	Tomillo	<i>Thymus zygis</i>	<i>Escherichia coli</i>	12.5 µg/L de aires	Inouye et al., 2001
		<i>Thymus zygis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	6.25 µg/L de aires	
	Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	100 µg/L de aires	
	Naranja	<i>Citurs sinensis var. Valencia</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	800 µg/L de aires	Velázquez-Nuñez et al., 2013
	Oregano mexicano	<i>Lippia berlandiere Sachauer</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	1,470.6 µg/L de aires	Gómez- Sanchez et al., 2011
	Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Bacillus cereus</i>	17.5 µg/L de aires	
		<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	34.9 µg/L de aires	López et al., 2007
Caja petri invertida	Tomillo	<i>Thymus vulgaris L.</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	17.5 µg/L de aires	
		<i>Thymus vulgaris L.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	26.2 µg/L de aires	
	Orégano	<i>Origanum vulgare L.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	62.5 µg/L de aires	
		<i>Origanum vulgare L.</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>	62.5 µg/L de aires	
	Canela	<i>Cinnamomum aromaticum Nees</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	250 µg/L de aires	Kloucek et al., 2012

riales opacos sin afectar los resultados, a diferencia de otros métodos que evalúan mediante turbidez o lectura de absorbancia (López-Malo et al., 2005).

2.1.2. Dilución y micro-dilución en caldo

El método de dilución y microdilución seriada se lleva a cabo en tubos o pocillos con medios líquidos (caldos), los cuales contienen concentraciones crecientes (serie de dilución doble) de AE diluido en el caldo, en el cual se inocula un número definido de células bacterianas. El volumen final de la prueba define si el método se denomina de dilución (cuando se utilizan tubos con un volumen total de 1-10 mL) o de microdilución

(si se realiza en placas de pocillos usando un máximo de 500 µL por pocillo). Posterior a la incubación (16-24 h dependiendo del microorganismo), la presencia de turbidez o sedimentación indica crecimiento del microorganismo. Finalmente, para rectificar la inhibición, se toman alícuotas de los tubos o pocillos sin turbidez y se hace un sembrado en agar.

La CMI en esta técnica se determina de acuerdo a la concentración más baja que impide el crecimiento visible del microorganismo. Estos métodos son mayormente utilizados en estudios con bacterias (López-Malo et al., 2005; Wiegand, Hilpert y Hancock, 2008).

2.1.3. Difusión en agar

El método de difusión en agar ha sido probablemente el más utilizado para determinar la actividad antimicrobiana contra microorganismos aeróbicos. En este método, existen dos formas de identificar la difusión y, por lo tanto, la efectividad del AE. En la primera, el agar solidificado se inocula con la suspensión requerida del microorganismo; un papel filtro es impregnado con una solución de concentración conocida del AE, el cual es colocado en la superficie del agar. En la segunda, se perfora el agar solidificado y previamente inoculado, usando un perforador estéril, y se vierte una solución de cierta concentración del AE en las perforaciones.

Posteriormente, las cajas Petri son incubadas a la temperatura y tiempo óptimos. El principio es la difusión del AE hacia todo el agar, lo que conduce a la inhibición del crecimiento bacteriano mediante la formación de zonas de inhibición. Lo anterior supone que el diámetro de las zonas aumentará al incrementar la concentración del AE (Bonev, Hooper y Parisot, 2008).

Los resultados de la prueba de difusión en agar son generalmente cualitativos. La susceptibilidad del microorganismo en prueba está relacionada con el tamaño de la zona de inhibición en milímetros. Los microorganismos se denominan susceptibles cuando el diámetro de la zona es mayor a 30-35 mm, intermedios cuando el diámetro de la zona varía entre 20 y 30 mm, o resistentes con una zona cuyo diámetro es menor a 15-20 mm (López-Malo *et al.*, 2005).

Por otra parte, este método no es tan apropiado para todos los AE, debido a que su alta volatilidad causará que algunos componentes químicos se evaporen durante la incubación; además, su hidrofobicidad impedirá la difusión de todos los componentes. Debido a lo anterior, aunque la determinación de la CMI puede obtenerse mediante esta técnica, otros métodos darían mejores resultados (Kalemba y Kunicka, 2003; López-Malo *et al.*, 2005).

2.1.4. Sembrado en espiral

La técnica de sembrado en espiral se ha utilizado para enumerar células en suspensión microbiana; no obstante, también se ha empleado para determinar las CMI de algunos agentes antimicrobianos (López-Malo *et al.*, 2005).

El método se basa en dispensar continuamente un volumen decreciente de una concentración conocida de AE en un medio sólido (agar) por medio del patrón de espiral de Arquímedes. Esto resulta en un gradiente del AE con una alta concentración cerca del centro de la caja Petri; el inóculo es sembrado radialmente sobre la superficie de la caja desde el borde exterior hasta el centro de la placa. Posterior a la incubación,

se mide y registra la distancia desde el final del crecimiento del microorganismo hasta donde comenzó. La CMI se puede calcular a partir del radio en el que se detiene el crecimiento. La distancia se utiliza para calcular la dilución tanto del inóculo como del AE, en comparación con un control (López-Malo *et al.*, 2005).

Aunque el método ha tenido bajo impacto tanto en la determinación de la actividad antimicrobiana como de la CMI de los AE, se ha demostrado su utilidad al evaluar la actividad de algunos compuestos como son el timol y el eugenol contra diferentes bacterias (Holley y Patel, 2005).

2.2. Fase vapor

El uso potencial que tienen los AE al utilizarlos de manera directa, se ha limitado principalmente por las alteraciones que causan en las características organolépticas de los alimentos. Por lo anterior, recientes investigaciones han planteado algunas soluciones a este problema, entre las cuales destaca la utilización de los vapores generados por los AE; lo que resultaría en una menor modificación sensorial en el producto final (Suhr y Nielsen 2003; Raybaudi-Massilia, Soliva y Beloso., 2006 y Goñi *et al.*, 2009). En este caso, el uso potencial de los vapores de los aceites esenciales sería un sistema en el que interactúen el producto, el ambiente y un empaque; sin tener que añadirlo como un aditivo alimentario (Kuorwel *et al.*, 2013).

Las técnicas de fase vapor se basan en la generación de vapores de los AE y la creación de una atmósfera a una cierta temperatura, o un microambiente dado por los propios AE (López *et al.*, 2005). Si bien el efecto que ejercen los vapores de los AE está siendo estudiado recientemente, los principales métodos utilizados se describen a continuación.

2.2.1. Caja Petri invertida

La técnica de caja Petri invertida consiste en colocar los agares inoculados de forma separada de los AE. Para ello, papel filtro impregnado con el AE previamente disuelto en acetato de etilo o en otro solvente, es colocado sobre la tapa de una caja Petri; posteriormente, la caja Petri que contiene en la base el agar solidificado e inoculado y en la tapa el papel filtro, se coloca de manera invertida. Con esto se espera una volatilización de los AE con dirección al microorganismo en prueba (Suhr y Nielsen, 2003; Kloucek *et al.* 2012).

La CMI será la menor concentración probada que inhibía el crecimiento del microorganismo. Esta técnica es mayormente utilizada para bacterias, las cuales tienen mayor velocidad de crecimiento en comparación con los mohos (Edris y Farrag, 2003).

2.2.2. Cámara hermética

La técnica de cámara hermética consiste en crear una atmósfera a partir de AE; para ello se utilizan cámaras de plástico (aproximadamente de 1-2 L) con tapa hermética transparente; en su interior y en el centro se coloca una cantidad conocida del AE y sobre una rejilla se colocan agares previamente inoculados. Las cámaras se mantienen a una temperatura controlada; en condiciones estándar para mohos a 25°C durante 72 horas (Suhr y Nielsen, 2003; Gómez-Sánchez, Palou y López-Malo, 2011) ó 37°C durante 18-24 horas para bacterias (Kloucek *et al.*, 2012). De tal manera que los vapores generados por los AE entran en contacto con los microorganismos y dan lugar a zonas de inhibición, disminución del crecimiento o reducción en el número de colonias. La CMI en esta técnica es la menor concentración de AE utilizada que logre inhibir el crecimiento visible de los microorganismos. Este método se usa principalmente para mohos, ya que su velocidad de crecimiento es lenta.

3. Determinación cualitativa y cuantitativa de los componentes químicos de los AE

Existe una variación en los componentes químicos mayoritarios de los AE presentes en diferentes entornos tales como un sistema modelo, una atmósfera controlada o un alimento. Asimismo, también existen diferencias en composición de acuerdo a las diferentes partes de la planta de donde se obtuvo el AE o de la especie de la misma. Entre los principales componentes químicos presentes en los AE se encuentran las diferentes clases de monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos (Figura 1) como son los alcoholes, cetonas, óxidos, aldehídos, fenoles o ésteres (tabla II) (Aridogân *et al.*, 2002).

Debido a la gran importancia que tienen los compuestos químicos de los AE, se han empleado diferentes métodos físicos y químicos que ayuden a determinarlos y cuantificarlos (Turek y Stinzing, 2013).

Los métodos de cromatografía acoplados a diferentes sistemas son los más utilizados para determinar la composición química de los AE, obteniendo información de identidad, posibles impurezas, adulteraciones, reacciones de degradación, así como de parámetros de calidad. Además, son una opción para una rápida separación cuantitativa de macro y microcomponentes con estructuras químicas simples o complejas (Marriott, Shellie y Cornwell, 2001).

3.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC por sus siglas en inglés) es una técnica que permite separar e identificar los componentes químicos de una muestra. Esta técnica utiliza un gas inerte como

Tabla II. Componentes volátiles de acuerdo al grupo funcional del aceite esencial

Grupo Químico Funcional	Componentes
Fenoles	Carvacrol
	Eugenol
	Timol
Aldehídos	Citral
	Citronela
	Benzaldehído
	Perilaldehído
	Cinamaldehído
Alcoholes	Terpenos
	Borneol
	Mentol
	Geraniol
	Linalol
	Feniletanol
Alcoholes sesquiterpenos	Farnecol
	Cedrol
Cetonas	Alcanfor
	Carvona
	α-tujona
Ésteres	Acetato de linalilo
	Salicilato de metilo
	Etil acetano
	Anetol
Ésteres y Óxidos	Metyl timol
	Anetol
	Cineol
Hidrocarburos	Careno
	β-cariofileno
	α-pineno
	Limoneneno

Adaptada de Inouye *et al.* (2006)

fase móvil y un líquido como fase estacionaria en una columna capilar; la fase móvil está constantemente recorriendo el sistema. Otro aspecto característico de la GC es que trabaja en un amplio rango de temperaturas (-70 a 400°C). La muestra a evaluar debe ser volatilizada antes de ingresar a la columna cromatográfica. En esta técnica pueden darse los fenómenos de adsorción y de partición (Hernández-Molina, 2007).

La GC es uno de los métodos de análisis más eficaces, ya que permite la separación de cantidades muy pequeñas; además se usa generalmente para análisis cuantitativo. La principal limitante para esta técnica es la termoestabilidad de la muestra, es decir, que mantenga su estructura a la temperatura de trabajo (Hernández-Molina, 2007).

Por otra parte, la cromatografía de gases acoplada a espec-

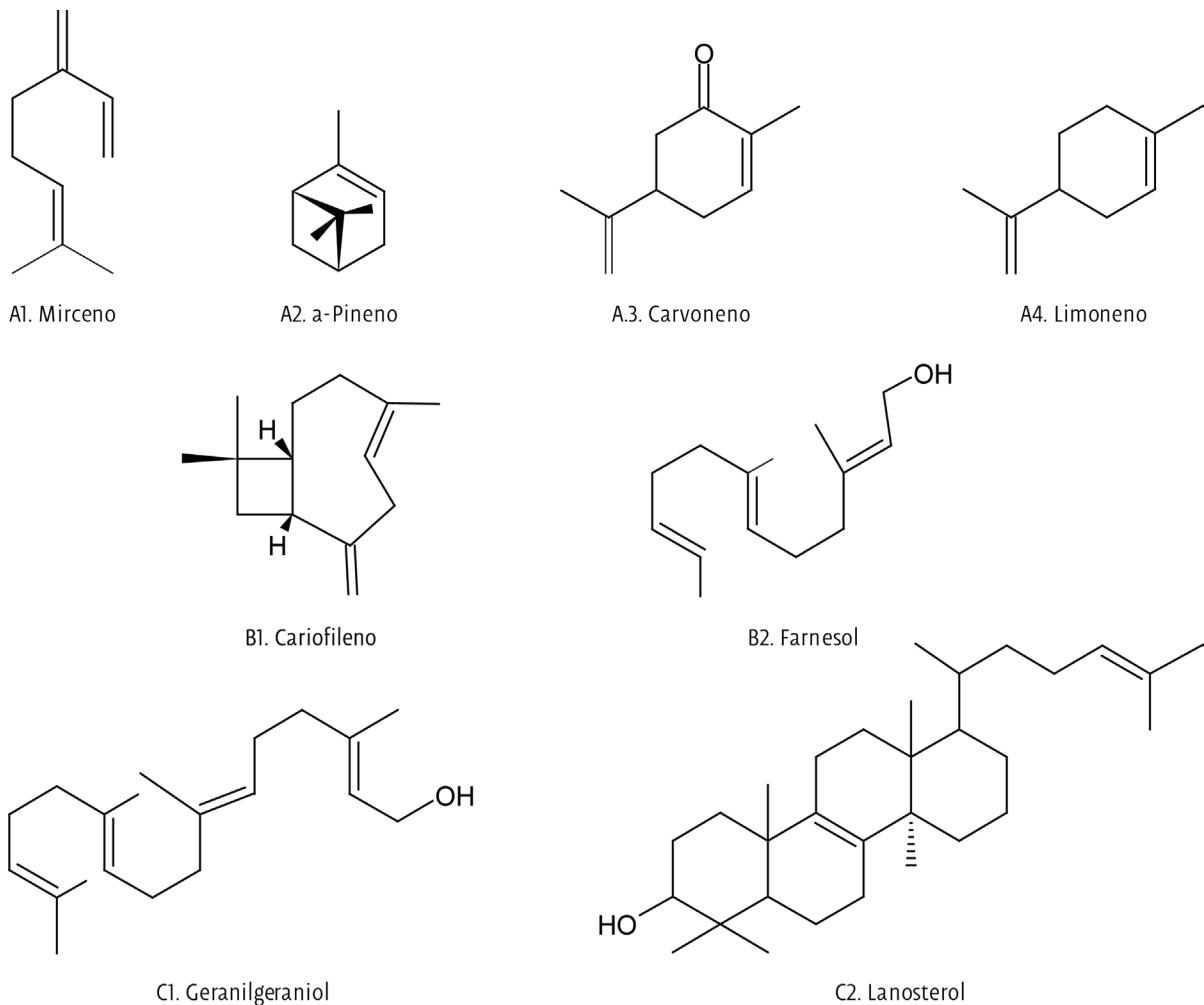


Fig. 1. Algunas estructuras químicas de (A) Monoterpenos, (B) Sesquiterpenos y (C) Diterpenos

trometría de masas (GC-MS por sus siglas en inglés) permite obtener el espectro de masas de cada componente, con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural, por lo que se logra identificarlos, ya que existen bases de datos con los espectros de masas de muchos componentes (Marriott *et al.*, 2001; Cserháti, Forgács, Deyl y Mikšík, 2005). La GC-MS da como resultado un cromatograma, que muestra los compuestos separados y el área del pico de cada uno de ellos, la cual es proporcional a su concentración (Cserháti *et al.*, 2005).

Numerosos estudios han empleado la GC-MS a fin de determinar cualitativa y cuantitativamente la composición química de los AE; estos estudios reportan resultados adecuados y repetibles. Ávila-Sosa, Palou, Jiménez-Munguía, Nevárez-Morillón y Navarro-Cruz. (2012) identificaron al eugenol (3.402 g/ml) y al cinamaldehído (0.652 g/ml) como componentes mayoritarios del AE de canela (*Cinnamomum verum*). Asimismo, determinaron que en el AE de orégano mexicano (*Lippia ber-*

landieri Schauer L) el timol (2.103 g/ml) y el carvacrol (0.533 g/ml) son los componentes presentes en mayor proporción. Por otra parte, Tian *et al.* (2011) identificaron 45 componentes en el aceite esencial de la cicuta (*Cicuta virosa L. var. latisepta* Celak) y determinaron que el γ -terpineno (40.92%), p-cimeno (27.93%) y el cuminaldehído (21.20%) son los componentes mayoritarios. Bendahou *et al.* (2008), por su parte, determinaron que timol (41.6%), γ -terpineno (27%), y p-cimeno (17.1%) son los componentes mayoritarios en el AE de orégano (*Origanum glandulosum*). La mayoría de las investigaciones que reportan la composición química de los AE utilizan GC-MS.

Si bien la GC-MS puede emplearse para identificar y cuantificar componentes químicos que pueden ser volatilizados, la correcta determinación y cuantificación de los componentes químicos presentes en una matriz de un alimento, en un producto empacado o en el AE recién obtenido, depende de un

adecuado muestreo o extracción del mismo (Hui, 2002; Sánchez-Cabrera y Pino, 2011).

3.2. Influencia de los métodos de extracción en la composición química

Para la determinación de los compuestos químicos de los AE relacionados con el sabor, efectos antimicrobiana y antioxidantes, se han empleado diferentes métodos de extracción; entre los más utilizados se encuentran la extracción con solventes orgánicos, la hidrodestilación (HD por sus siglas en inglés) (Périno-Issartier, Huma, Abert-Vian y Chemat, 2010), la extracción asistida con microondas (MAE por sus siglas inglés) la extracción con microondas libre de solvente (SFME por sus siglas en inglés) (Sparr y Björklund, 2000) y la extracción asistida con ultrasonido (UAE por sus siglas en inglés) (Vilkhu, Mawson, Simons y Bates 2008).

El uso de cualquier método de extracción para la posterior determinación de la composición química, ha sido criticado debido a los posibles procesos de transformación que sufren los compuestos por la influencia del calor y el vapor de agua (Richter y Schellenberg, 2007).

Diversas investigaciones han referido que entre los métodos de extracción más efectivos se encuentra MAE, debido a que requiere poca energía y hay una mejor retención de los compuestos químicos.

Uno de los estudios que fundamentan lo anterior, es el de Flamini *et al.* (2007) quienes determinaron y compararon los componentes químicos presentes en el AE de laurel (*Laurus nobilis L.*) obtenido por HD y por MAE, utilizando GC-MS para la cuantificación de los componentes; en este estudio concluyeron que los monoterpenos se obtenían solo con MAE. En la misma línea, Bendahou *et al.* (2008) determinaron la composición química del AE de orégano (*Origanum glandulosum*) extraído por medio de HD, MAE y SFME utilizando GC-MS; identificaron al timol, γ -terpineno, p-cimeno y carvacrol como los principales compuestos del AE, siendo la MAE el método de extracción que mejor retuvo los compuestos químicos. Por otro lado, en un estudio realizado por Lucchesi, Smadja, Bradshaw, Louw y Chemat (2007), se evaluó la influencia de HD y SFME en la composición química del AE de cardamomo (*Elletaria cardamomum L.*); se encontró que con SFME se obtuvieron mayores cantidades de compuestos oxigenados y menores cantidades de hidrocarburos y monoterpenos en comparación con HD.

Finalmente, se ha observado que los diversos métodos de extracción además de afectar a la retención de los componentes químicos, también pueden producir cambios físicos distinguibles en la materia prima (Lucchesi *et al.*, 2007).

3.3. Muestreo selectivo de analitos

Como se describió previamente, en la evaluación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales en fase vapor, el AE en estado líquido se coloca en un sitio cercano al medio de cultivo inoculado con el microorganismo en prueba, de tal manera que los compuestos volátiles del aceite entran en contacto con el microorganismo y ejercen su efecto sobre este; todo lo anterior se lleva a cabo dentro de un recipiente cerrado. En consecuencia, la determinación de la composición del aire en el espacio de cabeza de dicho recipiente, es fundamental para obtener información importante sobre los compuestos que pueden afectar al microorganismo. Para esto, es necesario tomar una muestra del aire en equilibrio con el AE, mediante una jeringa, para luego inyectarlo en el puerto de un cromatógrafo de gases. En este caso, el aire contendrá todos los compuestos volátiles que se hayan difundido tanto del aceite hacia el aire como del medio de cultivo hacia el aire, es decir, los analitos con actividad antimicrobiana no serán los únicos recolectados. En este sentido, un nuevo enfoque para la toma de muestras es la técnica de microextracción en fase sólida (SPME por sus siglas en inglés) que fue desarrollado por Pawliszyn en 1989 (Pawliszyn, 2000). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en diferentes campos de la química analítica y de alimentos (Hui, 2002). La SPME tiene ventajas significativas, tales como la reducción de consumo de solventes orgánicos y la no degradación de la muestra; además, es de bajo costo, rápida, sensible y selectiva, cuando es combinada con métodos de detección apropiados (Adam *et al.*, 2009).

El instrumento usado en esta técnica consta de una fibra de sílica fundida recubierta por un material capaz de retener solo cierto tipo de analitos (por ejemplo polidimetilxiloxano). Esta fibra está protegida por una aguja retractable. Para la toma de los analitos, la aguja se inserta a través de un septum en un espacio de cabeza, lo cual causa que la aguja se retrakte y deje la fibra expuesta. Entonces el recubrimiento de la fibra retiene los analitos compatibles con él. En seguida, la fibra con los analitos es retirada del espacio de cabeza, siendo nuevamente protegida por la aguja, y transferida al puerto de inyección de un GC, donde los analitos son térmicamente liberados, para luego ser identificados (Hui, 2002 y Vas Vékey, 2004).

Entre los estudios que han utilizado la SPME para el análisis de AE, puede mencionarse el de Popovici, Bertrand, Bagnarol, Fernández y Comte (2008), quienes utilizaron dos tipos de fibra; en este estudio identificaron 57 compuestos volátiles en el AE de mirto de brabante (*Myrica gale L.*). Así mismo, Fang, Qi, Li, Shao y Fu (2006), usaron SPME para muestrear los compuestos volátiles del AE de hinojo (*Foeniculum vulgare*).

Ambos estudios muestran la eficacia de la SPME cuando se requiere muestrear selectivamente compuestos volátiles de un AE; además refieren a la técnica como simple, rápida y factible.

Conclusiones y comentarios finales

La determinación de la concentración mínima inhibitoria es la forma más común para reportar la efectividad de los aceites esenciales como agentes antimicrobianos.

Los métodos de evaluación antimicrobiana de los aceites esenciales, tanto en fase vapor como por contacto directo, muestran ventajas y desventajas dependiendo principalmente del tipo de microorganismo objetivo. El utilizar la técnica adecuada permitiría obtener información certera sobre la efectividad del aceite esencial y la posibilidad de usarlo como agente antimicrobiano.

Los métodos instrumentales para la determinación de los compuestos químicos son herramientas relevantes para la identificación de los compuestos responsables del efecto antimicrobiano. Finalmente, el ahorro en tiempo, la reducción de solventes y la aparente simplicidad de las técnicas de muestreo selectivo de analitos continúan atrayendo el interés en el área de alimentos.

Agradecimientos

La autora Reyes Jurado agradece el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y de la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP) para la realización de sus estudios de Doctorado en Ciencia de Alimentos.

Referencias bibliográficas

- Adam, M., Dobiáš, P., Pavlíková, P. y Ventura, K. (2009). Comparison of solid-phase and single-drop microextractions for headspace analysis of herbal essential oils. *Central European Journal of Chemistry*, 7(3), 303-311.
- Aridoğan, B., Baydar, H., Kaya, S., Demirci, M., Ozbaşar, D. y Mumcu, E. (2002). Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Archives of Pharmaceutical Research*, 25(6), 860-864.
- Ávila-Sosa, R., Palou, E., Jiménez-Munguía, M., Nevárez-Moo-
rillón, G., Navarro-Cruz, A. y López-Malo, A. (2012). Anti-fungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2), 66-72.
- Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J., Bernardini, A. y Costa, J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 106(1), 132-139.
- Bonev, B., Hooper, J. y Parisot, J. (2008). Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1295-1301.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Chang, S., Chen, P. y Chang, S. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1), 123-127.
- Cserháti, T., Forgács, E., Deyl, Z. y Mikšík, I. (2005). Chromatography in authenticity and traceability tests of vegetable oils and dairy products: a review. *Biomedical Chromatography*, 19(3), 183-190.
- Cruz-Cabral, L., Fernández-Pinto, V., y Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 1-14.
- Edris, A. y Farrag, E. (2003). Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Journal Nahrung Food*, 47(2), 117-121.
- Fang, L., Qi, M., Li, T., Shao, Q. & Fu, R. (2006). Headspace solvent microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile compounds from *Foeniculum vulgare* Mill. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3), 791-797.
- Fisher, K. y Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology*, 19(3), 156-164.
- Flamini, G., Tebanoa, M., Cionia, P., Ceccarinib, L., Riccic, A. y Longo, I. (2007). Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. *Journal of Chromatography A*, 1143(1-2), 36-40.

- Gómez-Sánchez, A., Palou, E. y López-Malo, A. (2011). Anti-fungal activity evaluation of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on the Growth of *Aspergillus flavus* by gaseous contact. *Journal of Food Protection*, 74(12), 2192-2198.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R. y Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116 (14), 982-989.
- Hammer, K., Carson, C. y Riley, T. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990.
- Hernández-Molina, LR. (2007). Purificación cromatográfica de metabolitos secundarios de origen vegetal. En J. F., López-Olguín, A., Aragón-García, y A. M., Tapia-Rojas, *Avances en Agroecología y Ambiente* (Vol 1., págs. 173-192.). Puebla: Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. ISBN 9789689391074.
- Holley, R. y Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273-292.
- Hui, C. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(1-2), 23-30.
- Inouye, S., Takizawa, T. y Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 47(5), 565-573.
- Inouye, S., Uchida, K. y Abe, S. (2006). Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 12(4), 210-216.
- Kalemba, D. y Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829.
- Kloucek, P., Smid, J., Frankova, A., Kokoska, L., Valterova, I. y Pavela, R. (2012). Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Food Research International*, 47(2), 161-165.
- Kuorwel, K., Cran, M., Sonneveld, K., Milts, J & Bigger, S. (2013). Migration of antimicrobial agents from starch-based films into a food simulant. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 432-438.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 181-186.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R. y Nerín, C. (2005). Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6939-6946.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R. y Nerín, C. (2007). Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4348-4356.
- López-Malo, A., Palou, E., Parish, M. y Davidson, P. (2005). Methods for activity assay and evaluation of results. En P.M. Davidson, J., Sofos, y A. Branen, *Antimicrobials in Food* (3a edición, capítulo 21, págs. 659-680). Boca Ratón: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Marriott, P., Shellie, R. & Cornwel, I. C. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 936(1-2), 1-22.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. y Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73(2), 236-244.
- Pawliszyn, J. (2000). Theory of solid-phase microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, 38(7), 270-278.
- Périno-Issartie, S., Huma, Z., Abert-Vian, M. y Chemat, F. (2010). Solvent free microwave-assisted extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) food by-products. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1020-1028.
- Popovici, J., Bertrand, C., Bagnarol, E., Fernandez, M. y Comte, G. (2008). Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L. and antifungal activity. *Natural Product Research*, 22(12), 1024-1032.
- Raybaudi-Massilia, R., Soliva, R. & Beloso, O. (2006). Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frutas cortadas. En G., González-Aguilar y F., Cuamea, I *Simposio Iberoamericano de Vegetales Frescos Cortados*. San Pedro, SP Brazil. ISBN 968-5862-08-7
- Richter, J. y Schellenberg, I. (2007). Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(6), 2207-2217.
- Rizzolo, A., Gerli, F., Prinzivalli, C., Buratti, S. y Torreggiani, D. (2007). Headspace volatile compounds during osmotic

- dehydration of strawberries (*cvs Camarosa*): Influence of osmotic solution composition and processing time. *LWT - Food Science and Technology*, 40(3), 529-535.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. y Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91, 621-632.
- Sánchez-Cabrera, Y. y Pino, J. (2011). Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile compounds from spice essential oils in dry flavourings. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(10), 2118-2123.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J. y Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26(2), 118-122.
- Solórzano-Santos, F. y Miranda-Novales, M. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 136-141.
- Sparr, C. y Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
- Suhr, K. y Nielsen, P. (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 94(4), 665-674.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S. y Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199-1218.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Huang, B. y Wang, Y. (2011). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 464-470.
- Turek, C. y Stintzing, F. (2013). Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40-53.
- Tyagi, A. y Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126, 228-235.
- Vas, G. y Vékey, K. (2004). Solid- phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 233-254.
- Velázquez-Núñez, M., Avila-Sosa, R., Palou, E. y López-Malo, A. (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, 31(1), 1-4.
- Vilku, K., Mawson, R., Simons, L. y Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161-169.
- Wiegand, I., Hilpert, K. y Hancock, R. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175.