

Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre Cepas de Salmonella

ANTIMICROBIAL EFFECT OF CINNAMON ESSENTIAL OIL (*Cinnamomum zeylanicum*) ON *SALMONELLA* STRAINS

Mayra Montero-Recalde^{1,2}, Jessica Revelo I.¹, Diana Avilés-Esquivel¹,
Edgar Valle V.¹, Deysi Guevara-Freire¹

RESUMEN

El efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre cepas de *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhimurium* fue investigado. El aceite de canela se obtuvo a través del método de destilación por arrastre de vapor y sometido a decantación, almacenándolo en refrigeración a 4 °C. Se aplicó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos (10, 30, 50, 70, 90% de aceite de canela) y cinco repeticiones. La Concentración Mínima Inhibitoria determinada del extracto se verificó al 50, 70 y 90% del aceite. En agar Mueller-Hinton se observó cero crecimientos de colonias con respecto a la Concentración Bactericida Mínima. La cepa *Salmonella typhimurium* presentó mayor sensibilidad al aceite de canela que la cepa *Salmonella choleraesuis*, en referencia al diámetro de los halos de sensibilidad.

Palabras clave: fitoterapia; Concentración Mínima Inhibitoria; *Salmonella choleraesuis*; *Salmonella typhimurium*; antibiograma; McFarland

ABSTRACT

The antimicrobial effect of cinnamon essential oil (*Cinnamomum zeylanicum*) on strains of *Salmonella choleraesuis* and *Salmonella typhimurium* was evaluated. The cinnamon oil was obtained by the method of steam distillation, decanted, and stored at 4 °C. A completely randomized design was applied with five treatments (10, 30, 50, 70, 90% of cinnamon oil) and five replicates. The determined Minimum Inhibitory

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Cevallos, Tungurahua, Ecuador

² E-mail: ma.montero@uta.edu.ec

Recibido: 26 de abril de 2017

Aceptado para publicación: 15 de agosto de 2017

Concentration of the extract was verified at 50, 70 and 90% of the oil. On Mueller-Hinton agar, zero colony growth was observed with respect to the Minimum Bactericidal Concentration. The strain *Salmonella typhimurium* presented greater sensitivity to cinnamon oil than the strain *Salmonella choleraesuis* in relation to the diameter of the halos of sensitivity.

Key words: phytotherapy; Minimum Inhibitory Concentration; *Salmonella choleraesuis*; *Salmonella typhimurium*; antibiogram; McFarland

INTRODUCCIÓN

Los riesgos de contraer enfermedades al consumir productos de origen animal contaminados con bacterias resistentes como la *Salmonella Typhimurium* y *Choleraesuis* son cada vez más frecuentes. *Salmonella* spp son bacterias Gram-negativas que causan retraso del desarrollo y disminución de la conversión alimenticia, y se presentan con alta morbilidad y presencia de lesiones intestinales y mortalidad (Talavera *et al.*, 2011).

Una alternativa al uso, a veces indiscriminado, de antibióticos reside en la utilización de plantas medicinales o fitoterapia, la cual ha sido empleada en todo el mundo desde épocas remotas. El 67% de las especies vegetales medicinales son provenientes de países en desarrollo (Ministério da Saúde, 2006), donde se requiere estudios más profundos sobre el uso de ingredientes activos presentes en plantas, que se pueden usar en forma de esencias, aceites y extractos, y que podrían minimizar o eliminar el uso de productos químicos artificiales, así como reducir el impacto de los residuos químicos en el ambiente y en productos animales como carne, leche y huevos (SENA, 2012). Diversas plantas y extractos son utilizados, además, como aditivos nutricionales para el control de enterobacterias en animales de producción (Veiga, 2008; Loya *et al.*, 2009).

Los aceites esenciales obtenidos de las plantas han mostrado tener propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiparasitarias, antiinflamatorias, antidiarreicas y antimicóticas (Van-Zyl *et al.*, 2004). Además,

mejoran la conversión alimenticia y la palatabilidad de los alimentos, y estimulan las enzimas digestivas (Hernández *et al.*, 2004; Giannenas *et al.*, 2011). Estos productos son una alternativa viable al uso de aditivos artificiales y fármacos utilizados en la producción animal (Martínez *et al.*, 2015). El aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) es utilizado como bactericida gracias a su componente principal, el eugenol, presente en un 70-95% (Husain *et al.*, 1989; González, 2002). Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue obtener un producto natural y económico a base del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) para evaluar el efecto antimicrobiano en cepas certificadas de *Salmonella choleraesuis* y *S. typhimurium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de bacteriología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, Campus Querochaca, ubicada en el cantón Cevallos, Tungurahua, Ecuador, a 2750 msnm. El estudio se realizó en un ambiente controlado a 20 °C y humedad relativa de 48%, utilizando la cámara de flujo laminar para evitar contaminación.

Material Vegetal y Bacteriano

Como materia prima, se utilizó la corteza de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), adquirida en un mercado de la ciudad de Riobamba, Ecuador. Se obtuvieron cepas certificadas de *Salmonella enterica* subsp

entérica serovar *Choleraesuis* ATCC® 10708™* y *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium ATCC® 13311™*.

Aceite de Canela

Se utilizaron 3 kg de corteza de canela, que fue sometida a un proceso de destilación por arrastre de vapor utilizándose 250 ml de agua destilada. Se obtuvo 20 ml de aceite esencial de canela.

Aislamiento y Preparación del Inóculo

Se aislaron las bacterias certificadas a partir de la técnica de siembra en estría por agotamiento en Agar MacConkey y se incubaron a 37 °C por 24 h. En la preparación del inóculo se utilizó el método del medio de cultivo líquido o de Kirby-Bauer, para lo cual se tomó en asa bacteriológica cinco colonias aisladas de cada una de las cepas certificadas y se las transfirió mediante un hisopo a 5 ml de caldo cerebro corazón para ser incubadas a 37 °C por 2 h. Fueron estandarizadas al 0.5 de la escala de MacFarland a 620 nm en espectrofotómetro, obteniéndose 1.5×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Aceite Esencial de Canela - CMI y CMB

Se obtuvo un total de 20 ml de aceite esencial de canela. Se realizaron 5 diluciones: 10, 30, 50, 70 y 90% (v/v) con etanol al 25% (Maiefski *et al.*, 2009). Se transfirió 1 ml del inóculo estandarizado más 1 ml de las cinco concentraciones del aceite esencial de canela de cada una de las cepas y se incubaron a 37 °C durante 24 h, estableciendo la concentración mínima inhibitoria (CMI). Esta fue valorada por la falta de turbidez en los tubos. La determinación de esta variable permitió la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB), a través de la siembra de los tubos que no presentaron turbidez en agar MacConkey y su interpretación valorada a través del cero crecimiento de colonias en placa.

Discos de Sensibilidad

Se impregnó una gota para cada disco de sensibilidad con las cinco concentraciones del aceite esencial de canela y se refrigeraron por 24 h para evitar que el aceite se disemine por el agar.

La valoración de la actividad antibacteriana de las concentraciones de aceite esencial de canela y del control negativo (etanol al 99.8%) se realizó mediante dos técnicas:

- Difusión en medio líquido: Se inocularon las cepas en tubos de ensayo con caldo Cerebro-Corazón y la turbidez fue comparada con la del tubo #5 de la escala de McFarland. Se incubaron 10 tubos con un 1 ml de caldo con la cepa respectiva y 1 ml de aceite de canela a 37 °C por 24 h para obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). La concentración con menor turbidez se sembró en medio agar para la determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).
- Difusión en disco agar: Se sembraron las cepas en la superficie del agar Mueller-Hinton con los discos de sensibilidad. Se incubaron a 37 °C por 24 h y se evaluó el diámetro del halo de crecimiento con una regla milimétrica Hiantibiotic ZoneScale.

RESULTADOS

La interacción entre las concentraciones del aceite de canela y el crecimiento de las cepas *Salmonella choleraesuis* y *typhimurium* muestran un comportamiento definido a la razón de un incremento de la concentración y la turbidez reflejada (Cuadro 1). Los niveles de dilución de 10 y 30% en el caso de ambas cepas presentaron turbidez, refiriendo que existe un crecimiento bacteriano positivo, mientras que, en las concentraciones de 50, 70 y 90% no hubo turbidez, indicando ausencia de crecimiento bacteriano.

Cuadro 1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del crecimiento bacteriano enfrentado a cinco diluciones de aceite de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

Cepas	Diluciones del aceite de canela + etanol 99.8%					Control negativo (etanol 99.8%)
	10%	30%	50%	70%	90%	
	Turbidez					
<i>Salmonella choleraesuis</i>	+	+	-	-	-	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	-	-	-	+

La concentración mínima bactericida (Cuadro 2) muestra que en los tubos de 1 y 2 se presentó la formación de colonias, mientras que los tubos 3, 4 y 5 no hubo crecimiento de colonias en el medio sólido agar MacConkey; es decir, las concentraciones de 50, 70 y 90% de aceite de canela no permitieron el desarrollo de las dos cepas. Asimismo, el etanol no mostró un efecto inhibitorio sobre las bacterias.

En el Cuadro 3 se observa que las concentraciones de 50, 70 y 90% de aceite de canela mostraron diferencia significativa ($p < 0.001$) con relación a las concentraciones de 10 y 30% para *Salmonella choleraesuis*, en tanto que las concentraciones de 70 y 90% de aceite de canela mostraron diferencia significativa con las demás concentraciones para *Salmonella typhimurium* ($p < 0.001$).

DISCUSIÓN

El uso de aceites esenciales permite dar alternativas al uso de antibióticos que puedan crear resistencia y ser perjudiciales para la salud (Esquivel *et al.*, 2010); entre ellos el aceite de la canela, que ha demostrado tener un efecto antimicrobiano eficaz (Shiva, 2007). Asimismo, se puede utilizar aceites esencia-

les como antibióticos promotores de crecimiento debido a un componente en común que es el eugenol, el cual aumenta la secreción de enzimas digestivas y evita la proliferación de bacterias, mejorando el rendimiento a la canal (Marien *et al.*, 2006).

Al analizar los resultados obtenidos por el método de difusión en agar, se puede indicar que esta metodología es adecuada para evaluar de manera cualitativa y cuantitativa la actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela, tal como lo señala el NCCLS (2012). Esta técnica consiste en la medición del halo de inhibición del crecimiento bacteriano generado por un agente antimicrobiano.

En lo que respecta a la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria, se evidenció un efecto claramente marcado del aceite esencial de canela sobre el crecimiento bacteriano de las cepas en estudio. Fuselli *et al.* (2006) demostró incluso que concentraciones menores de aceite esencial (12.5%) pueden reducir la CMI y la CMB. Este mismo comportamiento lo reporta Borboa *et al.* (2010) con aceites esenciales de *Lippia palmeri*, *Thymus vulgaris* y *Cinnamomum zeylanicum* en diluciones de 1:1, 1:5 y 1:10 (v/v), mostrando efecto inhibitorio *in vitro* sobre la bacteria *Clavibacter michiganensis*.

Cuadro 2. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) del crecimiento bacteriano enfrentado a cinco diluciones de aceite de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

Cepas	Tubos de ensayo con diluciones de aceite y cepas bacterianas ¹					Control negativo (etanol 99.8%)
	1	2	3	4	5	
	Crecimiento					
<i>Salmonella choleraesuis</i>	+	+	-	-	-	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	-	-	-	+

¹ En cada tubo se colocó 1 ml de agar conteniendo 1.5×10^8 UFC y 1 ml de cada concentración del aceite esencial (al 10, 30, 50, 70 y 90%, respectivamente)

Cuadro 3. Halos de sensibilidad (en mm) de dos cepas bacterianas sometidas a cinco concentraciones de aceite de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

Cepas	Tratamientos					ESM	Valor de P
	10%	30%	50%	70%	90%		
<i>Salmonella choleraesuis</i>	11.4 ^b	14.8 ^b	19.0 ^a	18.8 ^a	21.6 ^a	0.89	<.0001
<i>Salmonella typhimurium</i>	14.6 ^c	21.2 ^b	26.0 ^a	20.6 ^b	29.4 ^a	0.81	<.0001

^{a,b,c} Medias con letras diferentes dentro de filas difieren significativamente ($p < 0.05$)

En este mismo sentido, Caballero *et al.* (2016) demostraron que los aceites esenciales de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*) a concentraciones de 0.05, 0.10 y 0.20 inhiben el crecimiento de microorganismos fúngicos como *Aspergillus flavus*. Los efectos reportados en estos estudios pueden estar relacionados con la presencia de eugenol y cimaldehído en los aceites esenciales, que actúan directamente sobre la membrana bacteriana inhibiendo el crecimiento de microorganismos fúngicos y bacterianos (Cava *et al.*, 2012). Por otro lado, Tong *et al.* (2005) encontraron que los aceites esenciales pueden inhibir el ciclo del ácido

tricarboxílico (TCA) del metabolismo de la respiración bacteriana, afectando el consumo de oxígeno de las bacterias, causando su muerte.

Alzamora *et al.* (2001) reportaron diámetros de halos de inhibición formados por el aceite esencial de canela para *S. typhimurium* de 30 mm y para *S. enteritidis* de 32 mm, mientras que Solarte (2015) utiliza 10 cepas clínicas de *S. typhimurium* obtenidas de varias especies domésticas, donde el aceite esencial de canela formó halos de inhibición de 14.33 a 16.33 mm; entretanto, en el presente estudio fueron de 21.6 mm para *Salmonella choleraesuis* y de 29.4 mm para

Salmonella typhimurium. Sin embargo, Barros *et al.* (2016), en estudios realizados sobre el uso del aceite esencial de canela recomienda un uso restringido, debido a que su uso continuo puede ocasionar efectos tóxicos en la membrana de los glóbulos rojos en humanos.

CONCLUSIONES

- Las cepas de *Salmonella* son sensibles a concentraciones de aceite esencial de canela a concentraciones de 50% o superiores.
- La cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* presentó mayor sensibilidad al aceite de canela que la cepa *Salmonella choleraesuis*, en referencia al diámetro de los halos de sensibilidad.

LITERATURA CITADA

1. **Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. 2001.** Medicina tradicional en el Perú: actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *Anal Fac Med* 62: 156-161. doi: 10.15381/anales.v62i2.4167
2. **Barros F, Oliveira R, Alves F, Bezerra L, Martins J, Melo H, et al. 2016.** Activity of essential oils of *Piper aduncum* and *Cinnamomum zeylanicum* by evaluating osmotic and morphologic fragility of erythrocytes. *Eur J Integrative Med* 8: 505-512. doi: 10.1016/j.eujim.2016.02.011
3. **Borboa J, Rueda E, Acedo E, Ponce J, Cruz M, García J, Ortega M. 2010.** Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* Subespecie *michiganensis*. *Trop Subtrop Agrosyst* 12: 539-547.
4. **Caballero C, Villacorta L, Pretell C. 2016.** Efecto del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y su combinación sobre la acción antifúngica en *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz (*Zea mays* L.), variedad morado. *Pueblo Continente* 22(1): 123-132.
5. **Cava R, Taboada A, Palop A, López A, Marin F. 2012.** Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in semi-skim milk supplemented with vanillin. *Int J Food Microbiol* 157: 314-318. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.003
6. **Esquivel P, Pedroza G, Sandoval N, Mata R, Mendoza L, Balderas I. 2010.** Ensayo químico dirigido y estudio del efecto antimicrobiano *in vitro* de algunos condimentos empleados en la cocina mexicana. *Rev Salud Públ Nutr* 10: 7 (Resumen).
7. **Fuselli S, García De La Rosa S, Gende L, Egúaraz, Fritz R. 2006.** Inhibición de *Paenibacillus larvae* empleando una mezcla de aceites esenciales y timol. *Rev Argent Microbiol* 38: 89-92.
8. **Giannenas I, Skoufos J, Giannakopoulos C, Wiemann M, Gortzi O, Lalas S, Kyriazakis I. 2011.** Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. *J Dairy Sci* 94: 5569-5577. doi: 10.3168/jds.2010-4096
9. **González R. 2002.** Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Rev Cubana Estomatol* 39: 139-156.
10. **Hernández F, Madrid J, García V, Orengo JJ, Megías MD. 2004.** Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility and digestive organ size. *Poult Sci* 83:169-174.
11. **Husain A, Virmani P, Misra N. 1989.** The major essential oil-bearing plants of India. Lucknow, India: Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants (CSIR). 49 p.

12. **Loya A, González A, Rivera J. 2009.** Prevalence of polypharmacy, polyherbacy, nutritional supplement use and potential product interactions among older adults living on the United States-Mexico border: a descriptive, questionnaire-based study. *Drugs Aging* 26: 423-436. doi: 10.2165/00002512-200926050-00006
13. **Maiefski M, Rupp M, Hermsen E. 2009.** Ethanol lock technique: review of the literature. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30: 1096-1108. doi: 10.1086/606162
14. **Marien M, Nauwynck H, Duchateau L, Martel A, Chiers K, L Devriese, Froyman R, et al. 2006.** Comparison of the efficacy of four antimicrobial treatment schemes against experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkey poults pre-infected with avian pneumovirus. *Avian Pathol* 35: 230-237. doi: 10.1080/03079450600-711052
15. **Martínez R, Ortega M, Herrera J, Garza J, Zárate J, Soriano R. 2015.** Uso de aceites esenciales en animales de granja. *Interciencia* 40: 744-750.
16. **Ministério da Saúde. 2006.** A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos. Brasilia: Ministério da Saúde. Série B. Textos Básicos de Saúde. 147 p.
17. **[NCCLS] National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2012.** Performance standars for antimicrobial disk susceptibility test. M02-A11 32(1). USA: NCCLS. 76 p.
18. **[SENA] Servicio Nacional de Aprendizaje. 2012.** Introducción a la industria de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Bogotá: Centro de Gestión de Mercados, Logística, TIC's. 87 p.
19. **Shiva C. 2007.** Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis Doctoral. Barcelona España: Univ Autónoma de Barcelona. 184 p.
20. **Solarte AL. 2015.** Aplicación de aceites esenciales para el control de *Salmonella typhimurium* aislada de casos clínicos en diferentes especies animales. Tesis de Maestría. Córdoba, España: Univ de Córdoba. 28 p.
21. **Talavera M, Varela J, Reyes N, Lagunas S, Carranza B, Alonso M, Velázquez V. 2011.** Resistencia antibiótica de genotipos de cepas de *Salmonella* spp de cerdos sacrificados en rastros del Estado de México. *Vet Méx* 42: 269-276.
22. **Tong G, Yulong M, Peng G, Zirong X. 2005.** Antibacterial effects of the Cu(II)-exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K88 and *Salmonella choleraesuis*. *Vet Microbiol* 105: 113-122. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.11.003
23. **Van-Zyl RL, Seatlholo S, Van-Vuuren S, Viljoen A. 2004.** The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *J Essen Oil Res* 18: 129-133.
24. **Veiga V. 2008.** Divulgação estudo do consumo de plantas medicinais na região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro/ : aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev Bras Farmacogn* 18: 308-313. doi: 10.1590/S0102-69