

Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina

Antibacterial activity of mandarin essential oil.

J. Martínez¹, B. Sulbarán de Ferrer², G. Ojeda de Rodríguez¹,
A. Ferrer¹ y R. Nava¹

Resumen

Se estudió la actividad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) variedad Dancy. Las cortezas de las frutas fueron prensadas al frío para la obtención del aceite. Las cepas bacterianas que se utilizaron para determinar la actividad antibacteriana fueron: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 259923, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, y *Escherichia coli* ATCC 25922. La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar utilizando las siguientes concentraciones de aceite: 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%. La CMI se determinó por el método de dilución en caldo utilizando 6 concentraciones. El aceite esencial presentó actividad antibacteriana del tipo bactericida contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* a todas las concentraciones excepto al 1%. La CMI del aceite esencial de mandarina variedad Dancy para *B. subtilis* fue de 9%, para *S. aureus* y *L. monocytogenes* fue de 7%. **Palabras clave:** Actividad antibacteriana, aceite esencial, *Citrus reticulata* Blanco, método de difusión en agar, prensado al frío.

Abstract

The antibacterial activity and the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of mandarin essential oil (*Citrus reticulata* Blanco) variety Dancy was studied. Fruit peels were cold pressed for oil extraction. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 259923, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC

Recibido el 19-3-2003 ● Aceptado el 30-6-2003

1 Laboratorio de Alimentos. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad del Zulia. Apartado postal 526. Maracaibo, Venezuela.

2 Laboratorio de Alimentos. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad del Zulia. Apartado postal 526. Maracaibo, Venezuela e-mail: grodriguez@icnet.com.ve

25922 were used to determine the antibacterial activity by agar diffusion in different essential oil concentrations: 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%. The MIC was determined by dilution in broth using six different concentrations. Mandarin essential oil showed anti-bacterial activity for *B. subtilis*, *S. aureus* and *L. monocytogenes* in all concentration but not at 1%. The MIC was 9% for *B. subtilis* and 7% for *S. aureus* and *L. monocytogenes*.

Key words: Anticibacterial activity, essential oil, *Citrus reticulata* Blanco, diffusion agar method, cold-pressed.

Introducción

Los aceites esenciales son productos obtenidos del reino vegetal, en los que se hallan concentrados sabores y aromas característicos. Están constituidos por mezclas complejas de hidrocarburos, compuestos oxigenados y residuos no volátiles (16). Los aceites esenciales están contenidos en glándulas o vesículas secretoras inmersas en los tejidos de las hojas, flores, corteza (pericarpio) y semillas de los frutos de muchas especies (3).

Las plantas pueden producir aceite esencial para muchos y diversos fines; por un lado protegen a la planta de plagas, enfermedades e inclusive de la invasión de otras plantas, para atraer insectos y aves (polinizantes). Estas cualidades de protección y atracción, se ven reflejadas en propiedades: antisépticas, antiinflamatorias, antidepresivas, afrodisíacas y otras, presentes en mayor o menor grado en la totalidad de los aceites (12, 13, 15).

El hombre desde la antigüedad ha usado sustancias naturales extraídas de las plantas, como los aceites esenciales, para combatir enfermedades y preservar alimentos. Hoy en día, estas sustancias han

perdido su uso debido a la aparición de sustancias químicas, no obstante, tienen la ventaja de que no representan un peligro para la vida y salud del hombre (7).

Por ello, en los últimos años se han realizado muchas investigaciones, que han demostrado el poder antimicrobiano de los aceites esenciales, especialmente los extraídos de frutas cítricas; en estos estudios se puede mencionar el de Dabbah y col. (3), quienes encontraron que los aceites esenciales de mandarina, naranja y toronja mostraron tener actividad antibacteriana contra cepas bacterianas de: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* entre otras. Asimismo, el trabajo de Morales (12) demostró que el aceite esencial de lima posee una actividad antibacteriana contra *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* y *Streptococcus lactis*.

Estos resultados hacen relevante el estudio de los aceites esenciales especialmente de cítricos debido a la gran importancia que tienen para la industria farmacéutica y de alimentos. Se sabe que los aceites esenciales, utilizados como aditivos en los

alimentos tienen efecto antimicrobiano y actúan al mismo tiempo como saborizante. (12)

El presente trabajo respondió al interés de determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina variedad Dancy, por el método de difusión en agar y determinar su Concentración Mínima Inhibitoria por el método de dilución

en caldo, sobre un rango de bacterias de origen clínico (*B. subtilis*, *S. aureus* ATCC 259923, *L. monocytogenes*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, y *E. coli* ATCC 25922) suministradas por el Centro de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo, Estado Zulia.

Materiales y métodos

Recolección de las muestras

Las muestras de frutos de mandarina variedad Dancy (*Citrus reticulata* Blanco) se recolectaron en plantaciones ubicadas en Nirgua, estado Yaracuy. Se seleccionaron en forma sistemática y aleatoria 15,85 Kg de frutos en completo estado de madurez fisiológica, los cuales se trasladaron al laboratorio en sacos. Los frutos se les retiró las cortezas y se refrigeraron, para su posterior procesamiento en un lapso no mayor de 2 días.

Se utilizó aceite esencial de mandarina como producto comercial, marca Gerch, para establecer las comparaciones con el aceite obtenido de las mandarinas variedad Dancy procesadas directamente.

Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas para comprobar la actividad antibacteriana del aceite esencial fueron: *B. subtilis*, *S. aureus* ATCC 259923, *L. monocytogenes*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, y *E. coli* ATCC 25922, suministradas por el Centro de Referencia Bacteriológica del

Hospital Universitario de Maracaibo, estado Zulia.

Las siete cepas bacterianas fueron cultivadas y mantenidas en caldo infusión cerebro corazón (ICC) y almacenadas a 4°C bajo refrigeración, hasta el momento de su utilización. Todas las cepas fueron activadas previo a su utilización, cultivándolos por 18 horas a 37°C en ICC.

Método de extracción del Aceite Esencial

Se utilizó el método de prensado al frío, el más utilizado a nivel de planta piloto, ya que con él se minimiza la oxidación de compuestos oxigenados o cualquier otro deterioro, para ello se secciona la corteza en tiras largas y se colocan entre dos placas de acero inoxidable frías (15 a 25°C) aplicando una presión de 2500 psi, obteniéndose la emulsión de aceite-agua, se winteriza, se ultracentrifuga (10°C a 6000 rpm x 15 min), se separan las fases aceite-agua y el aceite es almacenado en atmósfera de N₂ y en ausencia de luz (1).

Preparación de las diferentes concentraciones de aceite esencial

Se prepararon concentraciones

del aceite a 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%. Se tomó aceite esencial puro (100%) y se colocó en un balón aforado de 1ml, en el mismo momento del ensayo, usando etanol como solvente. Las muestras fueron protegidas de la luz, envolviendo los balones en papel de aluminio.

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina (variedad Dancy y commercial Gerch), esterilizado mediante filtrado con membrana Millipore de 22 m, se determinó utilizando la cepas bacterianas indicadoras, siguiendo la técnica de difusión en agar en placas (3) por triplicado.

Las placas contenían 18 ml de agar Mueller-Hinton atemperado a 45°C inoculado con un cultivo joven bacteriano de 106 ufc/ml previamente estandarizado (14). A cada placa se le perforaron 3 orificios de 4mm de diámetro cada uno utilizando un sacabocado estéril N° 4. A estos orificios se le añadió 10 l de cada una de las concentraciones de aceite esencial y las placas se incubaron a 25°C por 24 horas.

La actividad antibacteriana del aceite esencial se determinó midiendo el halo de inhibición alrededor de cada orificio (la distancia desde el borde del orificio hasta donde termina el halo), el tamaño de esta zona de inhibición indica si las bacterias objeto de análisis tienen una sensibilidad alta, intermedia o baja frente a las soluciones del aceite esencial. Se considera inhibitorio un valor de 2 mm (3,4,9,10). Para verificar el crecimiento alrededor del halo se tomó una asada

en esa zona, se inoculó en una placa de agar Mueller Hinton y se incubó por 24 horas a 25°C, y se observó si hay crecimiento.

Concentración Mínima Inhibitoria

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de mandarina se utilizó el método de dilución en caldo. Para este ensayo a 19,6 ml de caldo triptycasa soya (TSB) estéril contenido en erlenmeyer se le añadió una alícuota de 200 l de suspensión bacteriana de 106 ufc/ml, y posteriormente se le añadió una alícuota de 200 l de cada una de las siguientes concentraciones de aceite esencial: 4, 5, 6, 7, 8 y 9% para la variedad Dancy.

Para el aceite comercial Gerch se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, siendo las concentraciones utilizadas las que se indican a continuación: 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19% (de acuerdo con los resultados previos de actividad antibacteriana). Todas estas pruebas fueron realizadas por duplicado. Los erlenmeyers con suspensión bacteriana fueron incubados con agitación de 140 rpm en un baño Maria a 35°C por 36 horas. Luego se determinó la turbidez a 540 nm en un spectronic 20 a las 0, 6, 12, 18, 24 y 36 horas.

La menor concentración donde no se observó crecimiento bacteriano en cualquiera de los duplicados fue tomada como CMI. Después de determinar la CMI, el contenido del duplicado que no mostró incremento en la turbidez a cada intervalo de tiempo, fue inoculado por rayado sobre

placas contentivas de agar triptycasa soya (ATS), para comprobar si

realmente se había inhibido el crecimiento bacteriano (8).

Resultados y discusión

Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina variedad Dancy

La actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina variedad Dancy extraído por el método de prensado al frío, ya sea puro o diluido con etanol, fue del tipo bactericida. Dicha actividad se observó por la presencia de halos transparentes mayores de 2 mm alrededor de cada orificio en las placas utilizadas en el ensayo.

La figura 1 muestra la actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina variedad Dancy. Las cepas bacterianas *S. aureus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, todas bacterias Gram positivas, presentaron halos de inhibición de 4 y 5 mm de diámetro con una media de 5 mm en las concentraciones de 100 y 90%. A las concentraciones de 80, 70, 60 y 50% los halos fueron de 4 mm, en tanto que a concentraciones menores los halos fueron de 3 mm; se observó que al 1%

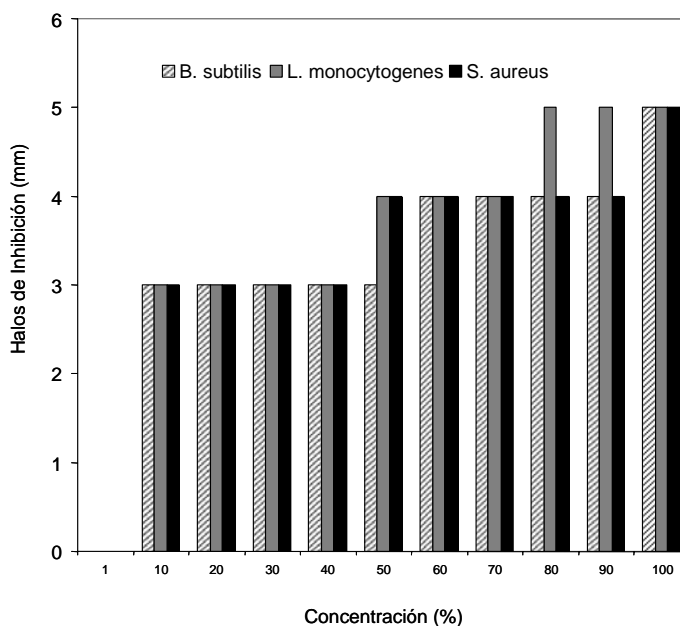


Figura 1. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina variedad Dancy

no se obtuvo actividad del aceite para ninguna de las cepas bacterianas. Todo esto fue confirmado al no haber crecimiento en las placas de agar Mueller Hinton.

P. aeruginosa, *E. coli*, *P. mirabilis* y *K. pneumoniae*, todas bacterias Gram negativas, no resultaron inhibidas en su crecimiento por ninguna de las concentraciones del aceite. Estos resultados son comparables a los de Dabbah y col. (3), donde aceites esenciales de cítricos presentaron mayor actividad antibacteriana frente a cepas bacterianas como *S. aureus* y *B. subtilis* y menor actividad contra *P. aeruginosa* y *E. coli*.

En la figura 2 se presenta la actividad antibacteriana del aceite

esencial de mandarina comercial Gerch. Las cepas bacterianas que fueron inhibidas por el aceite esencial de mandarina variedad Dancy también fueron inhibidas por el Gerch, sin embargo, los halos de inhibición en las concentraciones de 100 y 90% fueron de menor diámetro que los obtenidos en el Dancy; además, el comercial Gerch no inhibió ni al 10 ni al 1%. Estos resultados son comparables a los de Smith y col (15) donde las bacterias Gram positivas demostraron ser menos resistentes que las bacterias Gram negativas a los aceites esenciales de mandarina, limón y naranja.

Al realizar la comparación de la figura 1 con la figura 2 se observa que ambos aceites inhibieron a las mismas

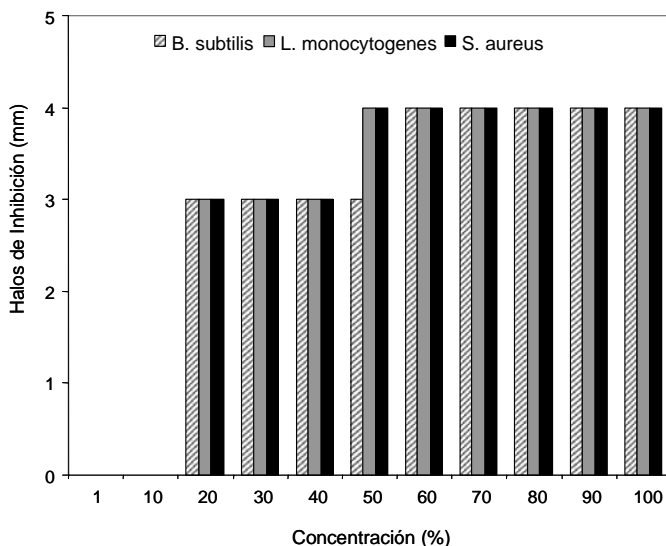


Figura 2. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina comercial Gerch

cepas bacterianas, que el aceite esencial de mandarina variedad Dancy fue más efectivo que el comercial Gerch (los halos de inhibición fueron menores en las concentraciones más altas) y además que el aceite esencial de mandarina variedad Dancy inhibió a partir del 10%, mientras que el comercial Gerch inhibió a partir del 20%.

Esta diferencia puede radicar en la diferente composición que presentan ambos aceites, también puede influir el método de extracción, el índice de madurez de la fruta, la variedad y las condiciones en que se almacenen los aceites esenciales (5).

Por otro lado, los aceites solo mostraron efecto inhibitorio contra las cepas Gram positivas debido a la estructura y constitución de su pared celular. (2, 5, 6, 9).

Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de mandarina variedad Dancy y comercial Gerch

En las figuras 3, 4 y 5 se presenta el comportamiento de cada una de las

cepas inhibidas por el aceite esencial de mandarina variedad Dancy. En la figura 3 se muestra el comportamiento de *B. subtilis* a las diferentes concentraciones de aceite analizadas, se puede observar que la concentración del 9% fue la CMI. La CMI fue del 7%, para *S. aureus* y *L. monocytogenes* (figuras 4 y 5), se observa como en las cepas bacterianas antes mencionadas a las 18 horas de incubación, que hubo diferencias en el crecimiento bacteriano con respecto a las concentraciones de aceite de 6, 5 y 4%.

En las figuras 6, 7 y 8 se observa el comportamiento de las cepas inhibidas por el aceite esencial de mandarina comercial Gerch. En la figura 6 se observa el comportamiento de *B. subtilis* contra las diferentes concentraciones, donde al 19% se toma como CMI debido a que no existió crecimiento bacteriano en todo el período de tiempo. Después de las 18 horas de incubación se puede apreciar la variabilidad en el comportamiento de la cepa contra las demás concentraciones de aceite.

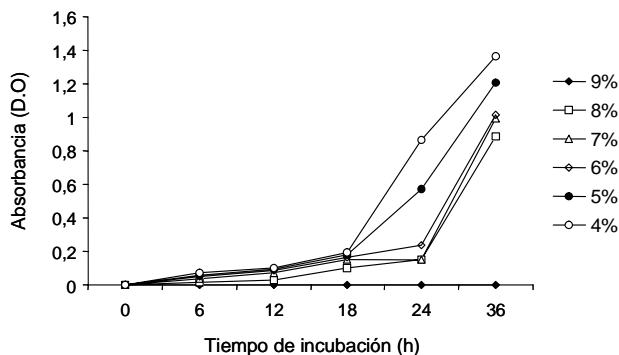


Figura 3. CMI del Aceite Esencial de Mandarina variedad Dancy contra *Bacillus subtilis*

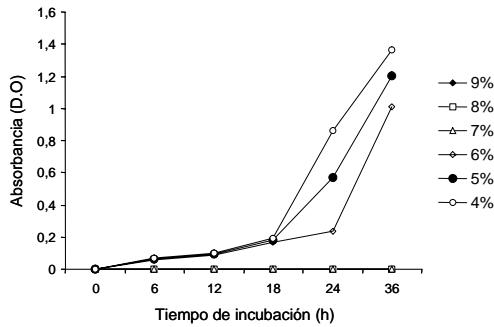


Figura 4. CMI del Aceite Esencial de Mandarina variedad Dancy contra *Staphylococcus aureus*

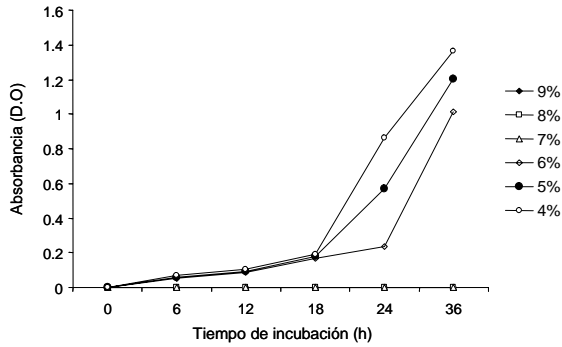


Figura 5. CMI del Aceite Esencial de Mandarina variedad Dancy contra *Listeria monocytogenes*

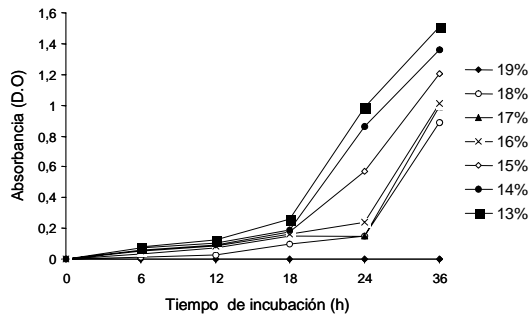


Figura 6. CMI del Aceite Esencial de Mandarina comercial Gerch contra *Bacillus subtilis*

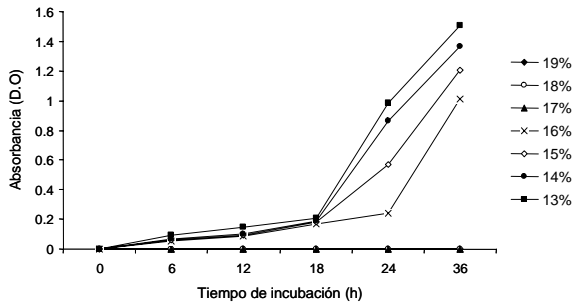


Figura 7. CMI del Aceite Esencial de Mandarina comercial Gerch contra *Staphylococcus aureus*

Mientras que para las cepas bacterianas *S. aureus* y *L. monocytogenes* (figuras 7 y 8) presentaron una CMI de 17%, ya que este fue el límite donde no hubo crecimiento bacteriano, porque a las concentraciones inferiores creció la

bacteria. Cabe destacar que a las 18 horas de incubación es donde se puede apreciar la diferencia en el comportamiento de la cepa bacteriana con respecto a las concentraciones de aceite de 16, 15, 14 y 13%.

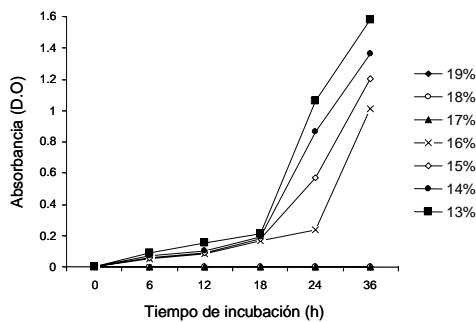


Figura 8. CMI del Aceite Esencial de Mandarina comercial Gerch contra *Listeria monocytogenes*

Conclusiones

Los aceites esenciales de mandarina variedad Dancy y comercial Gerch presentaron actividad antibacteriana del tipo bactericida contra las cepas bacterianas patógenas de origen clínico: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* las cuales son bacterias Gram positivas que producen enfermedades

muy graves para el hombre.

Los aceites esenciales de mandarina variedad Dancy y comercial Gerch presentaron las siguientes CMI: para *Bacillus subtilis* fue de 9% y 19%, respectivamente; para *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* fue de 7% y 17% para cada cepa bacteriana respectivamente.

Literatura citada

1. Araujo, D. 2000. Análisis Cromatográfico del aceite esencial de mandarina variedad Dancy (Citrus reticulata Blanco). Trabajo especial de Grado. LUZ. Facultad Experimental de Ciencias. Maracaibo, Venezuela. pp. 37-38
2. Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. N.Y. USA. pp. 602-603.
3. Dabbah, R., V.M. Edwards y W.A. Motas. 1970. Antimicrobial Activity of Some Citrus Fruits Oils on Selected Food-Borne Bacteria. *Appl. Microbiology*. 19 (1): 27-31
4. Dellacasa, A., C. Duschatzy, P. Bailac, A. Carrascull y M. Ponzi. 1999. Propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Heterotheca latifolia* Buck (Compositae). *J. Essent. Oil Res.* 11: 262-263
5. Domínguez, X. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Ediciones Limusa. México. p. 229.
6. Frazier, W.C y D.C. Westhoff. 1978. *Microbiología de los Alimentos*. Editorial Acribia S.A. 3era Ed. Zaragoza. España. p. 316.
7. Hersom, A.C y E.D. Hulland. 1974. *Conservas Alimenticias*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. pp. 61-62.
8. Kim, J.M. M.R. Marshall, J.A. Cornell, J.F. Preston y C.I. Wei 1995. Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in Culture Medium and on Fish Cubes. *J. Food. Sci.* 60 (6): 1364-1368.
9. Kim, J., M.R. Marshall y Ch. Wei. 1995. Antibacterial Activity of Some Essential Oil Components against Five Food-borne Pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2839-2845.
10. Lis-Balchin, M., G. Buchbauer, T. Hirtenlehner y M. Resch. 1998. Antimicrobial activity of Pelargonium essential oils added to a quiche filling as a model food system. *Letters in Applied Microbiology*. 27: 207-210.
11. Ministerio de Agricultura y Cría 1996. Anuario Estadístico Agropecuario 1995-1996. República de Venezuela. p. 402.
12. Morales de Godoy, V. 1996. Extracción y Caracterización del aceite esencial de Lima Thaití *Citrus aurantiifolia* (Chritms) Swingle. Trabajo especial de Grado. LUZ. Facultad Experimental de Ciencias, Maracaibo, Venezuela. pp. 18-19.
13. Müller, G. 1981. *Microbiología de los Alimentos Vegetales*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. pp. 152-153.

14. Power, D. Y. y C. McCuen. 1988. Manual de BBL, Products and laboratory procedures. Sixth edition. Maryland. U.S.A. pp. 43-48.
15. Smith, P.A., J. Stewart y L. Fyfe. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters in Applied Microbiology. 26 (2): 118-122.
16. Solomons, G. 1988. Fundamentos de Química Orgánica. Editorial Limusa, 1era Ed. España. p. 813