

Efecto del aceite de *Citrus reticulata* “mandarina” en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

Effect of oil of *Citrus reticulata* in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*

Efeito do óleo de *Citrus reticulata* “tangerine” em *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*

Pedro Mercado Martínez¹, Luis A. Llenque Díaz¹ y Sandra Vidal Eustaquio²

Resumen

El objetivo del trabajo fue determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial de *Citrus reticulata* variedad Satsuma (mandarina) sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y de *Staphylococcus aureus*. El aceite esencial se obtuvo por destilación por arrastre con vapor de las cascara. La CMI se evaluó usando seis macrodiluciones del caldo Muller-Hinton y tween 80 al 0.1%. Para evaluar la CMB se sembró en placas con agar Muller-Hinton. La CMI y CMB del aceite esencial de *Citrus reticulata* var. Satsuma sobre *S. aureus* fue de 5% y 7%, respectivamente; en tanto que para *P. aeruginosa* fue 13% 15%, respectivamente. De la comparación de los resultados se verifica que el aceite esencial de *C. reticulata* var. Satsuma resultó ser más eficaz a bajo porcentaje de concentración para los cultivos de *S. aureus* que los cultivos de *P. aeruginosa*.

Palabras clave: Concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida, aceite esencial, *Citrus reticulata* var. Satsuma, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

The objective of the research was to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of the essential oil from *Citrus reticulata* variety Satsuma (tangerine) on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Essential oil is obtained by distillation by steam of peels them. The MIC was assessed using six macrodiluciones of the Müller-Hinton broth and tween 80 at 0.1%. To evaluate the MBC was sown in plates with Müller-Hinton agar from the tubes without visual growth. MBC it sowed in plates with Müller-Hinton agar from the tubes without visual growth. The MIC and MBC of the essential oil from *C. reticulata* variety Satsuma on *S. aureus* was 5% and 7%, respectively; while *P. aeruginosa* was 13% 15%, respectively. Comparison of the results is verified essential oil of *C. reticulata* var. Satsuma was more effective at low concentration against cultures of *S. aureus* to *P. aeruginosa*.

Keywords: Minimum inhibitory concentration, minimal bactericidal concentration, essential oil, *Citrus reticulata* var. Satsuma, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Resumo

O objetivo do estudo foi determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de *Citrus reticulata* var. Satsuma (tangerina) sobre o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Óleo essencial é obtido por destilação a vapor das cascas-los. O CIM foi avaliada utilizando seis macrodiluciones da Müller-Hinton caldo e tween 80 a 0,1%. Para avaliar o WBC foi semeada em placas com ágar Müller-Hinton dos tubos sem crescimento visual. O CIM e CBM do óleo essencial de *Citrus reticulata* var. Satsuma no *S. aureus* foi de 5% e 7%, respectivamente e para *P. aeruginosa* foi 13% 15%, respectivamente. Comparação dos resultados é verificada que o óleo essencial de *C. reticulata* var. Satsuma foi mais eficaz em baixas concentrações para culturas de *S. aureus* às culturas de *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: concentração inibitória mínima concentração bactericida mínima, óleo essencial, *Citrus reticulata* var. Satsuma, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

¹ Universidad Nacional de Trujillo, pmartinez@unitru.edu.pe

² Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Univ. Nac. de Trujillo.

Introducción

En investigaciones anteriores se ha demostrado que tanto *Pseudomonas aeruginosa* como *Staphylococcus aureus* están asociados con problemas alimenticios, al mismo tiempo que presentar amplios patrones de resistencia a antibacterianos, lo que ha estimulado la búsqueda de tratamientos alternativos para las enfermedades ocasionadas por estas bacterias, constituyendo una extensa línea de investigaciones desde hace varios años (García y col., 2003; Huang y col., 2002; Luján y col., 2008; Montes y García, 1999; Wendt y Herwaldt, 1997).

Por los problemas que causan estas bacterias en la salud humana se han realizado estudios para encontrar soluciones sintéticas o naturales para tales menguar los efectos bacteriano, entre los cuales se registra el uso de productos naturales, destacando los aceites esenciales, que son compuestos aromáticos producidos por varios géneros de plantas y que poseen diferentes funciones biológica (Carrillo, 1999).

Un estudio revela la sensibilidad de las bacterias frente a la combinación de sustancias químicas, en tanto que con el aceite esencial de algunas frutas cítricas se ha reportado que éste posee características antifúngicas, antimicrobianas y fitoterapéuticas, las cuales la indican como una material biológico promisorio para su uso en actividades farmacéuticas, control de plagas en el sector agrícola, la preservación de los alimentos, y para evitar la proliferación de microorganismos causantes de enfermedades (Dabbah y col., 1970; Germaná y col., 1990).

Germaná y col., 1990 reportaron que el aceite esencial de mandarina presenta propiedades fungicidas, inhibiendo el desarrollo del hongo *Colletotrichum acutatum*. Cáceres y Bergonzelli *et al* extrajeron aceite esencial del flavedo de la mandarina *Citrus reticulata* Blanco o *Citrus tangerina* (Mandarina Dancy) para efectuar pruebas fitofarmacéuticas, comprobando que este aceite esencial presentaba capacidad inhibitoria hacia el crecimiento de bacterias tales como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Helicobacter pylori* y *Salmonella* sp que resultan ser patógenas para el hombre.

Considerando que Perú destaca en la siembra de *Citrus reticulata* variedad Satsuma “mandarina” (Martinez y col., 2003) y, que por lo general su flavedo se desecha; así mismo, que *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* son responsables de enfermedades transmitidas por alimentos y causantes de infecciones intrahospitalarias, además, existiendo pocos trabajos sobre las acciones de los aceites de frutos vegetales en bacterias de importancia sanitaria o sobre las concentraciones mínimas de este aceite esencial que se debe aplicar para lograr inhibir o causar la muerte a estas bacterias, el objetivo del estudio fue obtener el aceite esencial de la cáscara del fruto de *Citrus reticulata* var. Satsuma “mandarina” y evaluar su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.

Material y métodos

Los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* (FGB-001, FGB-002, FGB-003, FGB-004, FGB-005, FGB-006, FGB-007, FGB-008 y FGB-09) fueron obtenidas de

ambientes intra- hospitalarios y disponibles en el Laboratorio de Fisiología y Genética Bacteriana del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo. Los cultivos de *Staphylococcus aureus* (ST-001, ST-002, ST-003, ST-004, ST-005, ST-006, ST-007, ST-008 y ST-009), proporcionados por el Laboratorio de Referencia Regional “La Libertad” de la ciudad de Trujillo. Los frutos de *Citrus reticulata* variedad Satsuma “mandarina” fueron adquiridos en el mercado La Hermelinda, Trujillo.

Obtención del aceite esencial

Los frutos maduros de mandarina fueron lavados y se extrajeron las cáscaras (flavedos). Se colocó en el matraz 150 g de flavedos cortados en partes pequeños, luego se agregó agua destilada hasta la mitad del matraz y cuerpos de porcelana. Se colocó el matraz en una canastilla de calentamiento, se ajustó con fibra de vidrio y se sostuvo con unas pinzas. Se calentó cuidadosamente hasta ebullición, asegurando que el reflujo sea el adecuado.

El tiempo de extracción fue de 80 min, contándose desde el instante en el que cayó la primera gota en la pera de decantación. La fracción de aceite extraída se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min, y se separó la fase oleosa con la ayuda de una jeringa hipodérmica. El aceite esencial fue envasado en frascos de color ámbar y conservado en refrigeración.

Preparación de inóculos bacterianos

Cada cultivo bacteriano fue reactivado en caldo BHI por 18 horas a 37 °C y posteriormente sembrado en Agar BHI por 18 horas a 37°C. A partir de una pequeña cantidad de colonias, se hizo una suspensión en solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar la turbidez comparada con el tubo N°1 del Nefelómetro de Mac Farland, equivalente 3×10^8 UFC/mL, constituyendo el inóculo bacteriano.

Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de mandarina se realizó con el método de macrodilución en caldo; para el efecto se preparó un tubo control positivo para cada una de las bacterias en estudio, con caldo Muller-Hinton y 20uL de la suspensión bacteriana en un volumen final de 2mL, y un tubo control negativo, conteniendo caldo sin inocular.

En el sistema 1 se prepararon seis tubos con caldo Muller-Hinton y tween 80 al 0.1%, y se ajustaron a las concentraciones finales de 3; 4; 5; 6; 7; 8 % de aceite esencial *Citrus reticulata* variedad Satsuma, más 20uL de la suspensión bacteriana de *S. aureus* en un volumen final 2 mL. El sistema 2 se usaron seis tubos con caldo Muller-Hinton y se ajustaron a las concentraciones finales de 12; 13; 14; 15; 16; 17% de aceite esencial *C. reticulata* var. Satsuma con 20uL de la suspensión bacteriana de *P. aeruginosa* en un volumen final 2 mL.

Luego, todos los tubos fueron incubados a 37°C por 24 h. La lectura de la CMI del aceite esencial *C. reticulata* var. Satsuma para cada sistema de ensayo fue el primer tubo de la serie que no presentó crecimiento (turbidez). El procedimiento se realizó por triplicado

Concentración mínima bactericida del aceite esencial

La Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial se determinó a partir del primer y siguientes tubos de la serie de los sistemas de ensayo anterior que no presentaron crecimiento, se extrajo 100 µL de disolución y se sembró en placas Petri con agar Muller-Hinton diferentes, mediante la técnica de siembra en superficie. También se utilizó una placa Control Positivo para cada una de las bacterias, en agar Muller-Hinton sembrando 100 µL de suspensión del tubo Control Positivo del procedimiento anterior. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C.

La lectura de la CMB del aceite esencial para sistema de ensayo correspondió a la placa donde no se observó crecimiento bacteriano, equivalente a la menor concentración de aceite de *Citrus reticulata* var. Satsuma que mató el 99,9% del inóculo original. El procedimiento se realizó por triplicado.

Resultados

El aceite esencial obtenido y evaluado presentó efecto antibacteriano contra los cultivos de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, como se evidencia en la tabla 1, donde el aceite esencial de *Citrus reticulata* var. Satsuma tiene efecto inhibitorio y bactericida frente a *S. aureus* presentando como una CMI promedio del 5% y una CMB promedio de 7%; así mismo, se muestra que el aceite esencial actúa significativamente por igual contra los cultivos de *S. aureus* con $p < 0.05$.

Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida (porcentajes) del aceite de *Citrus reticulata* var. Satsuma “mandarina” sobre los cultivos de *S. aureus*.

Cultivos de <i>S. aureus</i>	Concentración Mínima Inhibitoria (%)	Concentración Mínima Bactericida (%)
ST-001	5	5
ST-002	5	7
ST-003	6	7
ST-004	5	7
ST-005	5	7
ST-006	5	7
ST-007	5	6
ST-008	6	7
ST-009	5	7
Promedio (\bar{x}):	5	7

$p < 0.05$

Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida (Porcentajes) del aceite de *Citrus reticulata* var. Satsuma “mandarina” sobre los cultivos de *P. aeruginosa*.

Cultivos de <i>P. aeruginosa</i>	Concentración Mínima Inhibitoria (%)	Concentración Mínima Bactericida (%)
FGB-001	13	15
FGB-002	14	16
FGB-003	13	15
FGB-004	13	15
FGB-005	14	16
FGB-006	13	15
FGB-007	14	15
FGB-008	13	15
FGB-009	14	16
Promedio (\bar{x}):	13	15

$p < 0.05$

En la tabla 2, los resultados demuestran que el aceite esencial de *Citrus reticulata* var. Satsuma tiene efecto inhibitorio y bactericida frente a cada uno de los cultivos *P. aeruginosa* evaluados presentando como una CMI promedio del 13% y una CMB de 15%. El análisis estadístico de los valores obtenidos determina que el aceite esencial actúa significativamente por igual contra los cultivos de *P. aeruginosa* con $p < 0.05$.

En la fig. 1, comparando los promedios de CMI y la CMB del aceite esencial *C. reticulata* var. Satsuma frente a cada una de las bacterias evaluadas, se demuestra que los valores sobre *S. aureus* es significativamente menor en relación a los promedios de CMI y CMB de este aceite frente a *P. aeruginosa*, presentando un $p > 0.05$.

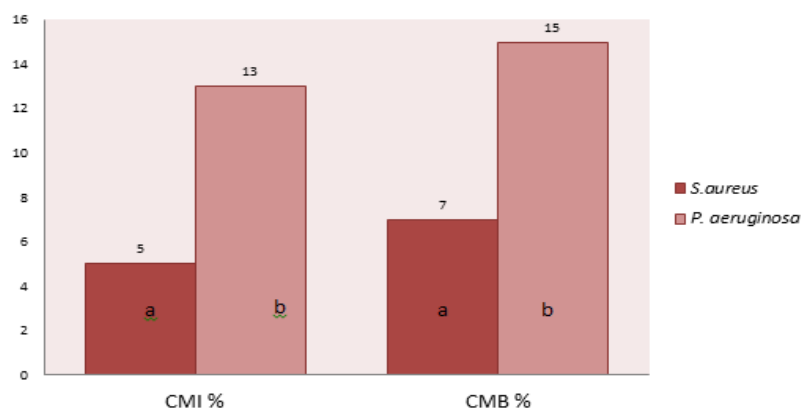


Figura 1. Comparación de los CMI y las CMB (%) promedios del aceite esencial de *Citrus reticulata* var. Satsuma sobre *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

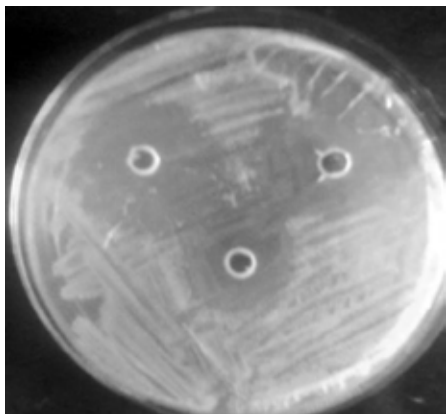


Figura 2. Halos de sensibilidad de *Staphylococcus aureus* frente a las concentraciones del aceite esencial de *C. reticulata* var. Satsuma.



Figura 3. Halos de sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* frente a las concentraciones del aceite esencial de *C. reticulata* var. Satsuma.

Discusión

El aceite esencial de *Citrus reticulata* var. Satsuma es una mezcla de sustancias orgánicas constituida por terpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos⁹ que se localizan en los flavedos de la mandarina y se obtuvieron por destilación por arrastre con vapor de agua, que resultó ser un líquido miscible en solventes orgánicos e inmiscibles en agua, que se mantuvo cubierta debido a la inestabilidad fotoquímica de los componentes del aceite (Martínez y col., 2003).

Estos resultados determinan que, el aceite esencial de *Citrus reticulata* var. Satsuma es más eficaz contra *S. aureus* que *P. aeruginosa*. Existen trabajos similares que corroboran con lo antes mencionado, como el de Dabbah y col.(1970), donde aceites esenciales de cítricos entre ellos, el aceite esencial de “mandarina”, tuvo mayor actividad antibacteriana frente a cepas como *S. aureus* y menor actividad contra cepas de *P. aeruginosa*.

Así mismo los resultados obtenidos por Martínez y col. (2003), determinan que la actividad antimicrobiana de la “mandarina” variedad Dancy resulta más eficaz contra bacterias Gram positivas como *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella* sp y *Proteus mirabilis*, que contra bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa*

La diferencia que existe en el efecto de este aceite esencial de mandarina frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* se debería a la diferencia de la estructura y constitución de su pared celular (Martínez, 2009). La identificación del componente principal de cítricos como la *Citrus reticulata* variedad Satsuma, determinó que más del 90% de este aceite lo compone el terpenoide limoneno el cual presenta una gran capacidad inhibitoria de crecimiento bacteriano en los alimentos, principalmente sobre las bacterias Gram positivas (Martínez y col., 2003).

El mecanismo de acción de los componentes de *Citrus reticulata* variedad satsuma no está esclarecida hoy en día, pero se sabe que los posibles sitios de acción de este aceite serían sobre la pared celular y/o membrana celular y sobre su acción enzimática o su estructura genética de su protoplasma (Kim y col., 1995).

El aceite esencial *Citrus reticulata* variedad satsuma es más eficaz frente a las bacterias de *Staphylococcus aureus* (Gram positiva), que contra *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa), esto es debido a los componentes que son propios de este aceite así también a las diferentes estructuras y constitución de sus membranas presentes en estas bacterias.

Conclusiones

El aceite esencial de *Citrus reticulata* variedad Satsuma “mandarina” tiene efecto inhibitorio y bactericida sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* con una CMI de 5 %, CMB de 7% y CMI de 13%, CMB 15 % respectivamente.

El efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus reticulata* variedad Satsuma “mandarina” no presentó diferencia significativa entre cultivos de la misma especie.

El aceite esencial de *Citrus reticulata* variedad Satsuma “mandarina” resultó ser significativamente más eficaz contra los cultivos de *Staphylococcus aureus* que contra los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Referencias bibliográficas

- Albado, P., Saez, E., Ataucusi, G. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Rev. Med. Hered, ene./mar.* 12 (1):16-19.
- Cáceres A. (1996). *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. Ed. Universitario. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Carrillo, I. (1999). *Efecto de la actividad de agua, pH y temperatura de incubación en la capacidad antimicótica de mezclas de benzoato de sodio-vainilla*. UDLAP.
- Dabbah, R., E., Motas W. (1970). Antimicrobial Activity of Some Citrus Fruits Oils on Selected Food- Borne Bacteria. *Appl. Microbiology*, 19 (1): 27-31.
- García, R., Casal, M., Rodríguez, F. (2003). Evolución de la resistencia antibiótica de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Bacteriodes fragilis* (1997-2001). *Rev. Esp. Quimioterap*; 16(4): 421-427
- Germanà, M., De Pasquale, F., Bazán, E., Palazzolo, E. (1990). Sugli oli essenziali delle differenti parti del fiore di diverse cloni de *Citrus aurantium*, L. *Essenze Derivati Agrumari*, 50(3): 287-296.

- Gil, M. (2000). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de resistencia a la meticilina. *Rev. Chil. Infect.* 17(2): 145-152
- Huang, C., Lin, T., Wang, Ch. (2002). Community acquired *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in previously healthy infants and children: analysis of forty-three episodes. *Pediatr Infect Dis J.* 21: 1049-52
- Kim, J., Marshall, M., Wei, Ch.(1995). Antibacterial Activity of Some Essential Oil Components against Five Food-borne Pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2839-2845.
- Luján, R., Ibarra, T., Mamani, H. (2008). Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital universitario en Lima, Perú. *Rev Biomed.* 19:156-160.
- Martínez, J., Sulbaran De Ferrer, B., Ojeda, R. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Rev. Fac. Agron.*; 20 (4): 502-512.
- Martínez, M. (2009). *Morfología y estructura bacteriana*. Bogotá.
- Montes, R., García, R. (1999). Eficiencia de extractos vegetales para el control de *Alternaria solani* en jitomate. *Fitopatología*; 29(1): 55.
- Wendt, C., Herwaldt, L. (1997). *Epidemics: Identification and management*. En: Wenzel RP, Ed. *Prevention and control of nosocomial infections* (3° ed.). Baltimore (MD): Williams and Wilkins.