

## Sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a concentración de aceite de *Citrus reticulata* variedad Satsuma "mandarina"

Pedro E. Mercado Martínez<sup>1</sup>, Luis A. Llenque Díaz<sup>1</sup>, María V. Trujillo Laguna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología Universidad Nacional de Trujillo, Perú, peemercado\_@hotmail.com; lullediaz@yahoo.com

Recibido: 21-10-2013

Aceptado: 09-06-2014

### RESUMEN

En esta investigación se determinó la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a diferentes concentraciones del aceite de *Citrus reticulata*, variedad Satsuma "mandarina". El aceite se obtuvo por el método de destilación por arrastre con vapor de agua, a partir del flavedo de la mandarina y para determinar la sensibilidad antibacteriana se emplearon cultivos de *S. aureus* y de *P. aeruginosa*. La sensibilidad de estos microorganismos se determinó por el método de difusión en agar utilizándose concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100% de aceite. Se utilizó la Vancomicina y Ciprofloxacina como controles para *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente. Se encontró que *S. aureus* y *P. aeruginosa* presentaron mayor sensibilidad a las concentraciones 60, 80 y 100% de aceite de *C. reticulata* var. Satsuma "mandarina". También se determinó que *P. aeruginosa* es más sensible a Ciprofloxacina que a las concentraciones del aceite mientras que *S. aureus* presentó mayor sensibilidad a la concentración del 100% de aceite que al control positivo (Vancomicina) ya que formó un halo de sensibilidad de mayor tamaño que al antibiótico. Se concluye que las bacterias en estudio son sensibles al aceite esencial de *C. reticulata* variedad Satsuma "mandarina."

**Palabras clave:** Sensibilidad bacteriana, aceite esencial, *Citrus reticulata*, Difusión en agar.

### ABSTRACT

This study aimed at determining the sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* against different concentrations of oil *Citrus reticulata* variety Satsuma "Tangerine". The oil was obtained by the method of distillation by steam stripping of water from the flavedo of tangerine and to determine the antibacterial sensitivity cultures of *S. aureus* and *P. aeruginosa* were used. The sensitivity of these microorganisms were determined by the agar diffusion method used in concentrations of 20, 40, 60, 80 and 100% oil. Vancomycin and Ciprofloxacin were used as controls for *P. aeruginosa* and *S. aureus*, respectively. It was found that *S. aureus* and *P. aeruginosa* showed higher sensitivity levels to 60, 80 and 100% of oil of *Citrus reticulata* var. Satsuma "Tangerine." It was also found that *P. aeruginosa* is more sensitive to Ciprofloxacin than concentrations of oil while *S. aureus* showed increased sensitivity to the concentration of 100% of oil rather than the positive control (Vancomycin) as halo formed a larger sensitivity than the antibiotic. We conclude that bacteria in study are sensitive to oil of *C. reticulata* variety Satsuma "Tangerine".

**Keywords:** Bacterial sensitivity, oil, *Citrus reticulata*, Diffusion in Agar

## I. INTRODUCCIÓN

La población crece aceleradamente y con ella la transmisión de enfermedades infecciosas producidas por bacterias, virus, hongos, etc. La mayoría de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son de origen bacteriano (García, 2000:48) que se adquieren por el consumo de alimentos y/o agua contaminados, representando un gran riesgo para la población en general (Brack y Heinz, 2002: 32).

Las infecciones ocasionadas por cepas de *S. aureus* son un problema de salud importante en todo el mundo. Las cepas de *S. aureus* producen una gran variedad de infecciones incluyendo osteomielitis, endocarditis invasora, artritis séptica y septicemia (Jensen y cols, 1999: 16). La contaminación de alimentos está asociada con una forma de gastroenteritis que se manifiesta clínicamente por un cuadro caracterizado por vómitos y diarrea (Lowy, 2002: 522); la incidencia es desconocida pero es probablemente una de las causas de enfermedad transmitida por alimentos más frecuentes (Dinges y cols, 2000: 18). Entre los alimentos implicados se encuentran: ensaladas de papas y huevos, pastelería, jamón, pollo, cremas heladas.

*Pseudomonas aeruginosa* tiene una distribución mundial, es cosmopolita (Soberón, 2007:12). Se aísla de suelos, agua, plantas, animales, incluyendo al hombre; algunas veces es patógeno para animales y vegetales por lo que representa un importante problema de salud, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, con cáncer, quemados o a los internos en terapia intensiva; ya que puede producir complicaciones graves. La situación se agrava porque la bacteria presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos o desinfectantes (Huang y cols, 2002: 1451). Se caracteriza por formar agregados bacterianos (biopelículas) que contaminan los dispositivos que se implantan dentro del cuerpo (Mull y cols, 2001:385), como por ejemplo, dispositivos intrauterinos, catéteres o válvulas cardíacas (Huang y cols, 2002: 1452). Así mismo, representa un serio problema en la industria alimenticia ya que puede descomponer los alimentos tales como vegetales crudos, agua, leche no pasteurizada que se mantienen en refrigeración (Mull y cols, 2001:387).

La presencia de estos microorganismos en los alimentos así como en el ambiente intrahospitalario conduce a buscar alternativas de inhibición y eliminación con una mayor posibilidad de aplicación como pueden ser las sustancias naturales (Kalemba y Kunicka, 2003: 814). Algunas especies vegetales tales como *Citrus reticulata* se han reportado que poseen características antifúngicas, antimicrobianas y fitoterapéuticas, las cuales le hacen una especie promisoría para su uso en actividades farmacéuticas, control de plagas en el sector agrícola y la preservación de los alimentos para evitar la proliferación de microorganismos causantes de enfermedades (Carrillo, 1999: 12). Existe una gran variedad de reportes en los cuales se utilizan diferentes vegetales como preservantes de alimentos (Oussalah y cols, 2006:1046), pero son pocos los trabajos que relacionan su acción contra microorganismos patógenos y menos contra patógenos intrahospitalarios, como *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Lambert, 2001: 454).

El hombre desde la antigüedad ha usado sustancias naturales extraídas de las plantas, como los aceites, para combatir enfermedades y preservar alimentos. Hoy en día, estos preservantes naturales han perdido su uso debido a la aparición de sustancias químicas. Sin embargo, estas sustancias tienen la ventaja de que no representan un peligro para la vida y salud del hombre (Oussalah y cols, 2006:1048).

Los aceites son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y cubren un amplio espectro de actividades tales como efectos farmacológicos, antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos; otros tienen características biocidas contra una amplia gama de organismos como bacterias, hongos, virus, protozoos, insectos y plantas (Smith y cols, 1998: 120). Por ello, son importantes en la industria de alimentos (condimentos y saborizantes), cosmética (perfumes y aromatizantes) y farmacéutica (Morales, 1996:18). Se ha estudiado la importancia de estos aceites debido a su disponibilidad, a los pocos efectos secundarios o a la toxicidad que pueden causar al hombre, así como la mejor biodegradabilidad comparado con antibióticos y preservantes disponibles. Por todas estas propiedades, se ha evaluado el control que pueden ejercer estos compuestos contra microorganismos patógenos en alimentos, y por tanto la posibilidad de ser utilizados como un método de eliminación de microorganismos patógenos (Conner y Beuchat, 1984:429).

Muchas hierbas y especias han sido utilizadas durante siglos para proporcionar sabores diferentes a los alimentos y éstas pueden presentar también actividad antimicrobiana (Ultee y cols, 2002: 1561) ya que producen una gran cantidad de compuestos secundarios como protección contra ataques microbianos e insectos. De hecho, muchos de estos compuestos han sido usados en forma pura o extractos vegetales como alimento o aplicaciones médicas en humanos (Kim y cols, 1995: 2840; Wallace, 2005: 26). Los compuestos responsables de esta actividad son a menudo fracciones del aceite, las cuales consisten principalmente en compuestos fenólicos (Conner, 1993: 443), que presentan actividad antimicrobiana (Akgul y Kivanc, 1988: 202; Albado, 2001:17) tienen gran aplicación para el control de crecimiento de patógenos en alimentos por lo que se utilizan como

métodos de preservación. Se ha reportado que la actividad antimicrobiana se deriva de terpenoides y compuestos fenólicos en los aceites (Dellacasa, 1999: 262; Acosta, 2003: 20; Takarada, 2004: 62).

Poco se sabe acerca de los mecanismos de acción antimicrobiana, de los compuestos mayoritarios de algunas especias, como la naranja, mandarina y otros cítricos, ya sea de forma individual o como parte del aceite esencial completo (Rhayour, 2003:357; López y cols, 2005: 6). Los sitios de acción de los agentes antimicrobiano en la célula microbiana, incluye a la membrana celular, pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético (Albado, 2001:19), todos ellos estratégicos para la supervivencia de los microorganismos y cualquier acción sobre ellos puede inactivar a la célula microbiana.

Los compuestos utilizados como antimicrobianos tiene varios sitios de ataque dentro de las células microbianas y que dependiendo de las concentraciones utilizadas en los alimentos, pueden causar inhibición o inactivación de los microorganismos (Martínez, 2001: 9). La actividad antimicrobiana de los aceites, se basa en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales (Conner, 1993: 446). Una vez que el compuesto fenólico cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y con las proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así a la actividad celular (Stashenko, 2007: 580).

Un método ampliamente utilizado para la evaluación de los antimicrobianos naturales es el conocido como “zona de inhibición.” Se trata de un método sencillo, sin embargo, el efecto inhibitorio del compuesto que se va a evaluar, dependerá de su habilidad para difundirse en el medio; este método, cae en la clasificación de los llamados de punto final y se le conoce como “ensayo de disco”, siendo uno de los requisitos para obtener resultados confiables y repetibles es que el microorganismo a evaluar se desarrolle rápida y uniformemente (Martínez, 2001: 6).

La industria de los cítricos en Perú se encuentra en constante crecimiento debido principalmente a la demanda de naranja, mandarina y recientemente, limón (Smith y cols, 1998: 121). Se cultivan algunas variedades de mandarina, entre las cuales destacan las variedades, Satsuma, Clementinas, Tangerinas y Tangelos.

Teniendo en cuenta que, en general, el flavedo de la mandarina se desecha, existe la posibilidad de viabilizar de manera comercial la extracción del aceite esencial del mismo mediante arrastre con vapor de agua (Lozano; 2005: 15). Toda la planta contiene aceite y principios amargos (flavonoides); las hojas maduras pueden contener alcaloides, taninos y monoterpenos, las flores contienen además glucósidos y cumarinas y la del flavedo (cáscara del fruto) contiene  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno, limoneno, p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, linanol, acetato de linalilo,  $\alpha$ -terpineol, citronelol, acetato de geranilo, N-metilantranilato de metilo, entre otros componentes (Cáceres,1996: 229).

La actividad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de mandarina (*C. reticulata* “Blanco”) variedad Dancy, fue determinada presentando una actividad antibacteriana de tipo bactericida contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* a todas la concentraciones excepto al 1% mientras que la CMI del mismo aceite esencial para *B. subtilis* fue de 9%, y para *S. aureus* y *L. monocytogenes* fue de 7% (Martínez, 2003:505). Se investigó la composición química del aceite esencial extraído de las variedades de mandarina *Citrus reshni* (Mandarina Cleopatra), *C. reticulata* (Mandarina común) y *C. reticulata* Blanco o *C. tangerina* (Mandarina Dancy), variedades de mandarina que se producen en Guatemala. Para realizar la separación, identificación y cuantificación de los principales componentes de los aceites esenciales se realizaron análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, esta técnica instrumental permitió establecer que los aceites esenciales poseían al menos 28 componentes, 7 de los cuales se encontraban presentes en las tres variedades de mandarina investigadas. Las tres variedades de mandarina presentaron altas concentraciones relativas del hidrocarburo monoterpénico limoneno seguido del  $\gamma$ -terpinoleno y en menor concentración relativa, el  $\alpha$ -terpineol y  $\beta$ -pineno. La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas permitió establecer también los tiempos de retención, así como la concentración relativa para cada uno de los componentes y más importante aún, esta técnica instrumental permitió identificar a cada uno de los componentes principales presentes en cada variedad, incluso los que se encontraban a niveles traza, tal es el caso del acetato 9-decenílico, el sabineno, el  $\alpha$ -terpineno, el 1-octanol, el Z-citral y el (+)-2-careno (Mazariegos, 2008: 69-70).

El consumo de alimentos contaminados con *S. aureus* o las infecciones con *P. aeruginosa* en infección intrahospitalaria, ha hecho que cada vez más países reconozcan la necesidad de someter especies naturales a ciertas pruebas o estudios enfocados en evaluar su efecto sobre microorganismos patógenos. Además; existe un gran número de trabajos donde se demuestra la acción antibacteriana que tienen los aceites de diferentes especies de vegetales como el orégano, el ajo, incluso algunos cítricos como la naranja, la toronja incluso de mandarina *C. reticulata* Blanco (Dancy) contra microorganismos patógenos.

Teniendo en cuenta que en el Perú se cultiva principalmente mandarina *C. reticulata* variedad Satsuma, y que no se han reportado estudios sobre el efecto del aceite extraído de esta planta sobre diferentes microorganismos patógenos, y teniendo en cuenta que por lo general el flavedo de mandarina se desecha, se llevó a cabo la obtención del aceite del flavedo a partir del cual se evaluó su actividad antibacteriana frente *S. aureus* y *P. aeruginos* para ser propuesto como conservante de alimentos.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Objeto de estudio

El objeto de la investigación estuvo constituido por aceite de frutos maduros de *Citrus reticulata* variedad Satsuma “mandarina” obtenidos en el mercado “La Hermelinda” Trujillo, Perú.

Se utilizaron cultivos puros de:

- *P. aeruginosa* (FGB-001 a FGB-009), aislados de ambientes intrahospitalarios, proporcionados por el Laboratorio de Fisiología y Genética Bacteriana de la Universidad Nacional de Trujillo.
- *S. aureus* (ST-001 a ST-009), proporcionados por el Laboratorio Referencial del Ministerio de Salud de la ciudad de Trujillo.

### 2.2 Métodos y técnicas

#### Obtención de frutos maduros de *C. reticulata* variedad Satsuma

Se adquirió 20 kg de los frutos de mandarina y colocados en bolsas de primer uso y trasladados al laboratorio.

#### Obtención del aceite esencial

Se seleccionaron aquellas mandarinas que no presentaron magulladuras, cortes o demás lesiones en su flavedo. Fueron lavados con agua corriente a chorro y posteriormente se pelaron los frutos limpios, extrayendo la cascara y colocados en recipientes estériles. Después de eliminar la parte blanca de la cascara, el flavedo de las mandarinas se cortó en trozos pequeños.

Se colocó 150 g del flavedo en un balón de 1L del equipo de extracción por arrastre de vapor de agua, se calentó en una cocina hasta alcanzar la temperatura de ebullición del agua. El aceite esencial obtenido por condensación fue una mezcla de aceite más agua. Se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min, y la separación de la menor porción de agua se hizo con la ayuda de una jeringa. El tiempo de extracción fue de 80 min, contándose desde el instante en el que cayó la primera gota en la pera de decantación. Finalmente, el aceite fue envasado en frascos ámbar y se conservó en refrigeración a 4 °C para los análisis posteriores.

#### Reactivación de los cultivos bacterianos

Cada cultivo bacteriano fue reactivado en caldo infusión cerebro corazón (BHI) por 18 h a 37 °C y posteriormente sembrado en Agar BHI por 18 h a 37 °C.

#### Estandarización de los inóculos bacterianos

Las colonias de cada bacteria fueron suspendidas en solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar la turbidez equivalente al tubo N°1 del Nefelómetro de Mac Farland ( $3 \times 10^8$  UFC/mL), realizándose el recuento respectivo para comprobar dicha concentración.

#### Preparación de las diferentes concentraciones de aceite esencial

El aceite obtenido fue considerado como tratamiento al 100%, a partir del cual se realizaron diluciones para obtener las concentraciones de 20, 40, 60 y 80% de aceite de *C. reticulata*; utilizando como solvente etanol absoluto. Estas disoluciones se mantuvieron en oscuridad.

### Prueba de Sensibilidad

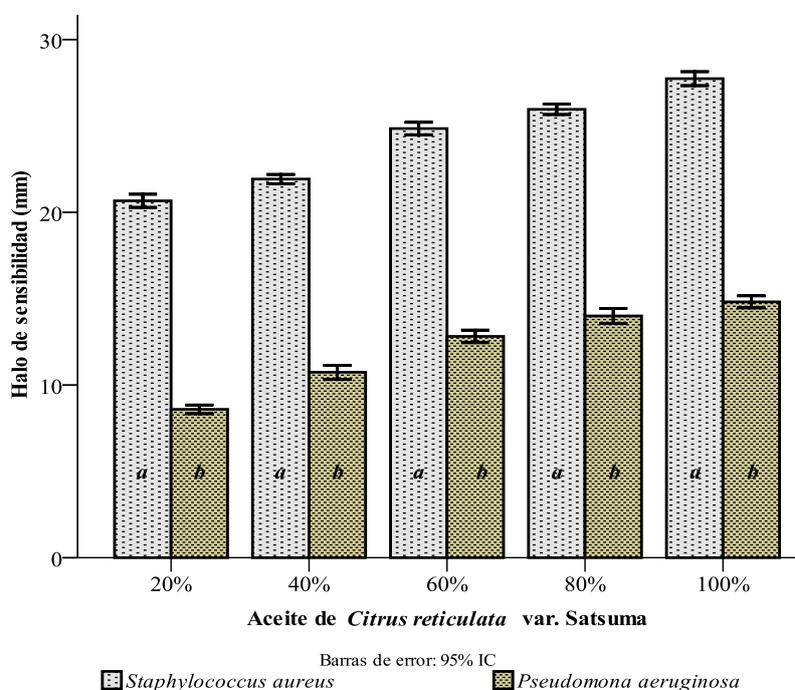
En placas Petri con 20 mL de agar Mueller-Hinton, por triplicado se sembró la suspensión bacteriana preparada con el cultivo joven bacteriano y estandarizado al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland, con la ayuda de un hisopo estéril humedecido con el cultivo, se sembró por estría. A cada placa se le hizo 3 orificios de 4 mm de diámetro y 4 mm de profundidad cada uno utilizando un sacabocado estéril, posteriormente a cada orificio se agregó 50 uL de cada una de las concentraciones de aceite esencial y las placas se incubaron a 37°C por 24 h. Se midió el halo de inhibición de crecimiento bacteriano a las concentraciones evaluadas del aceite esencial. También se evaluaron tres placas control utilizando discos de los antibióticos Vancomicina y Ciprofloxacina como controles positivos para cada cultivo y como control negativo se agregó 50 uL de etanol absoluto.

### Análisis Estadístico

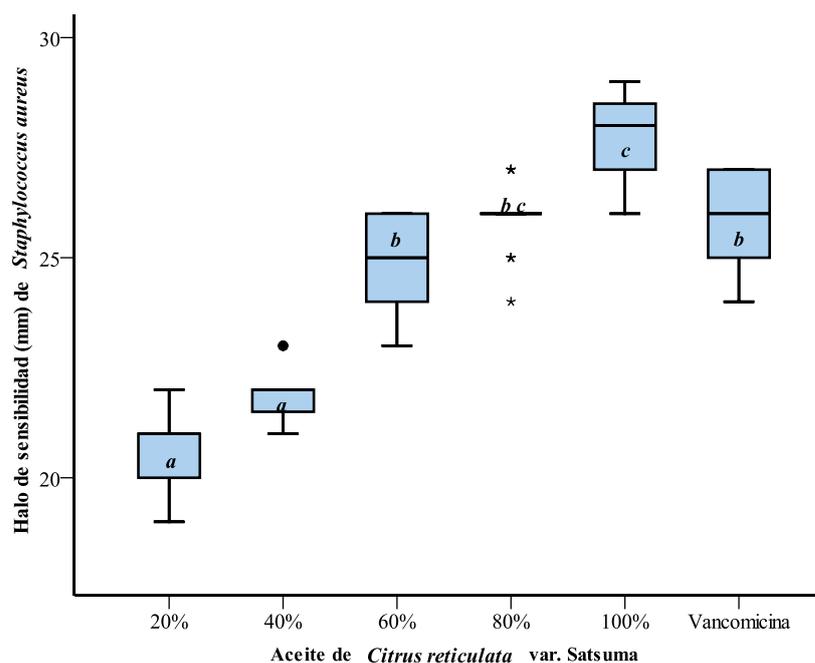
Los halos de sensibilidad (mm) de *S. aureus* y *P. aeruginosa* fueron sometidos al test de Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución normal de los valores (Normal:  $p > 0.05$ , y No Normales:  $p < 0.05$ ). Como los valores no siguieron una distribución normal fueron analizados con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para determinar diferencia significativa entre tratamientos, posteriormente se realizó la prueba de comparaciones múltiples no paramétrica de Dunn con un intervalo de confianza del 95%, y para determinar la diferencia significativa entre concentraciones de aceite y cultivo de bacteria se utilizó del test Z de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras independientes; para lo cual se utilizaron los programas estadísticos para lo que se utilizaron los programas estadísticos SPSS Statistics 17.0 para Windows, G-Stat 2.0 y Microsoft Office Excel 2007.

## III. RESULTADOS

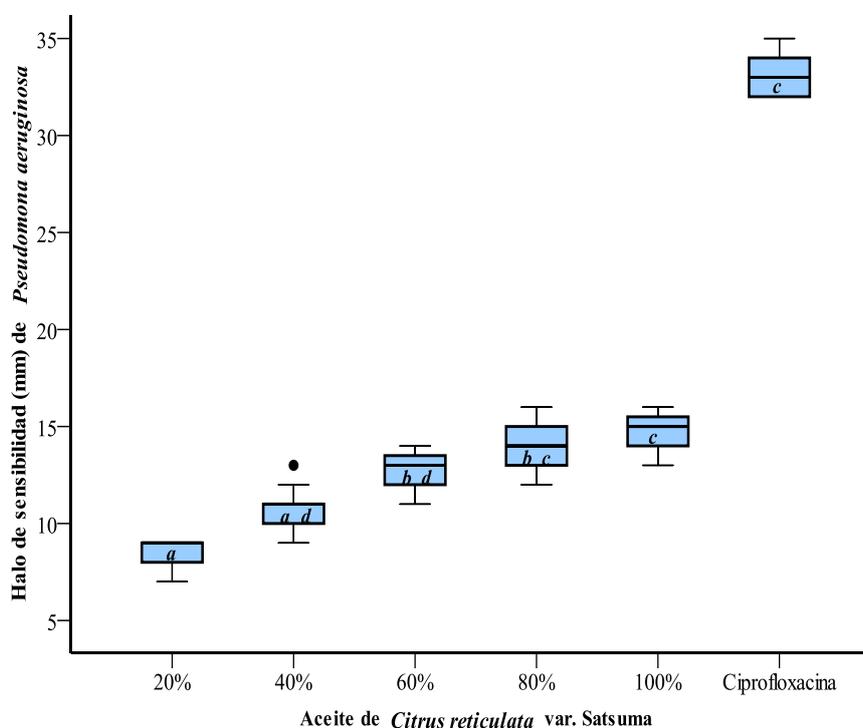
En las Fig. 1-3, se comparan el tamaño promedio de los halos de sensibilidad en mm de *S. aureus* y de *P. aeruginosa* a diferentes concentraciones de aceite de *C. reticulata*, *C. reticulata* var. Satsuma, Vancomicina y Vancomicina.



**Fig. 1.** Comparación de tamaño promedio de los halos de sensibilidad en mm de *S. aureus* y de *P. aeruginosa* a las concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100% de aceite de *C. reticulata*.  $p < 0,05$ . Letras diferentes presentan diferencia significativa entre grupos.



**Fig. 2.** Tamaños de los halos de sensibilidad en mm de *S. aureus* a las diferentes concentraciones de aceite de *C. reticulata* var. Satsuma y a la Vancomicina (grupo control).  $p < 0.05$ . Letras diferentes presentan diferencia significativa entre grupos.



**Fig. 3.** Tamaño de los halos de sensibilidad en mm de *P. aeruginosa* a las diferentes concentraciones de aceite de *C. reticulata* var. Satsuma y a la Ciprofloxacina (grupo control).  $p < 0.05$ . Letras diferentes presentan diferencia significativa entre grupos.

#### IV. DISCUSIÓN

Las especie vegetales cítricas poseen características antifúngicas (Kalemba y Kunicka, 2003:820), antimicrobianas y fitoterapéuticas, las que las hacen una especie promisoría para evitar la proliferación de microorganismos causantes de enfermedades (Carrillo, 1999: 25); así tenemos que los aceites de naranja y toronja mostraron tener actividad antibacteriana contra cepas bacterianas de: *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *Salmonella* entre otras (Smith y cols, 1998: 118). Se ha demostrado la actividad antibacteriana de diversos aceites (Pérez, 2006: 114), aunque poco se sabe acerca de los mecanismos de acción antimicrobiana de los compuestos mayoritarios de algunas especias (Rhayour, y cols, 2003: 358), como la naranja, mandarina y otros cítricos, ya sea de forma individual o como parte del aceite esencial completo (López y cols, 2005: 5). En los resultados obtenidos se observa que tanto *S. aureus* como *P. aeruginosa* son sensibles al aceite de *C. reticulata* var. Satsuma, formando halos de inhibición con diámetros entre 21 y 28 mm y de 9 y 15 mm, respectivamente.

Se extrajeron aceite esencial del flavedo de la mandarina *C. reticulata* Blanco o *C. tangerina* (Mandarina Dancy) para efectuar pruebas fitofarmacéuticas, comprobando que este aceite esencial presentaba capacidad inhibitoria hacia el crecimiento de bacterias tales como: *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *H. pylori* y *Salmonella* sp que resultan ser patógenas para el hombre (Cáceres, 1996: 285; Bergonzelle y cols, 2003: 3241). 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.

En la Fig. 1 se observa que *S. aureus* tiene una menor sensibilidad frente a la acción del aceite de *C. reticulata*, para las concentraciones de 20 y 40%, por la medición de los halos de inhibición, 21 y 22 mm respectivamente, en comparación con el halo de sensibilidad formado por el antibiótico Vancomicina (Control) que fue de 26 mm, que estadísticamente tiene un  $p < 0.05$ , lo que demuestra que existe diferencia significativa entre los halos de sensibilidad formado entre cada una de estas concentraciones de aceite con el formado por el control positivo (Vancomicina), el cual es significativamente mayor a los formados por las concentraciones de 20 y 40%. Se observa, que los halos de sensibilidad formados a las concentración de 60 y 80% del aceite respecto al halo de sensibilidad formado por Vancomicina presentan un  $p > 0.05$ , lo que significa que no existe diferencia significativa entre la eficacia de estos tratamientos, indicando que tienen el mismo efecto sobre *S. aureus*, mientras que el halo formado a la concentración del 100% de aceite supera al halo formado por el antibiótico Vancomicina, presentando un  $p < 0.05$ , lo cual indica que el halo de sensibilidad formado por el aceite al 100% es significativamente mayor al formado por el control positivo (Vancomicina). Estos resultados nos permite asegurar que *S. aureus* es significativamente más sensible al 100% de aceite de *C. reticulata* var. Satsuma que al antibiótico control utilizado, determinando que mientras mayor sea la concentración del aceite, *S. aureus* presentará una mayor sensibilidad.

En la Fig. 1, también se observa que el mayor halo de sensibilidad de *P. aeruginosa* fue de 15 mm y el menor de 9 mm a las concentraciones de aceite del 100% y 20% respectivamente; sin embargo, presentó un halo de sensibilidad de 33 mm frente a Ciprofloxacina, el cual es mucho mayor que el formado frente al 100 % de aceite, existiendo un  $p < 0,05$ , lo cual indica que la bacteria es menos sensible al aceite de *C. reticulata* var. Satsuma que al antibiótico control (Ciprofloxacina). Es decir, la bacteria *P. aeruginosa*, presentó menor sensibilidad al aceite esencial que *S. aureus*, estos resultados son los mismos encontrados en trabajos anteriores (Sartoratto et al. 2004 y Demo et al., 2005), ésta diferencia se debería a la estructura de sus membranas ya que las Gram negativas (*P. aeruginosa*), poseen una pared celular más compleja compuesta por dos capas situadas por fuera de la membrana citoplasmática, la primera y más cercana a la membrana es similar (más delgada) a la de las bacterias Gram positivas, está constituida por péptidoglicanos, la segunda denominada membrana externa está constituida por fosfolípidos con ácidos grasos saturados y entre las dos capas se halla un espacio periplásmico rico en enzimas, esta estructura les confiere un mayor grado de resistencia a los agentes antimicrobianos (Martínez, 2009), además poseen mecanismos de defensa como: presencia de  $\beta$ -lactamasas, modificación enzimática del agente antimicrobiano, cambios en la permeabilidad de la

membrana externa debida a la presencia de bombas de expulsión, etc., que generan dificultades para encontrar sustancias que sean efectivas contra ellas (Leal, 1997:62).

Al comparar los promedios de los halos de inhibición de cada concentración de aceite presentado (Fig. 1), observándose que en todas sus concentraciones *S. aureus* presenta mayor sensibilidad en comparación con la sensibilidad presentada por *P. aeruginosa*; siendo la concentración de 100 % la que tiene mejor efecto sobre ambas bacterias. La actividad biológica demostrada en este estudio coincide con los resultados obtenidos por Martínez y colaboradores en el 2003 quienes observaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *C. reticulata* variedad Dancy contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella* sp. y *Proteus mirabilis* y menor actividad frente a *P. aeruginosa*; así como los hallazgos de Sartoratto et al. (2004) quienes determinan que las bacterias Gram negativas: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. cholerae suis* y *V. cholerae* y las bacterias Gram positivas: *S. aureus* y *B. cereus*, mostraron diferentes grados de sensibilidad, concluyendo en que el aceite de *C. reticulata* posee alta actividad microbiana contra todas las bacterias Gram positivas evaluadas que contra las Gram negativas

Bergonzelli y colaboradores 2003, en su estudio sobre la caracterización de los componentes del aceite de algunos cítricos como la mandarina, la naranja, la lima y la Toronja han demostrado que poseen los siguientes compuestos como componentes mayoritarios: limoneno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mircenol, p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, linalol, acetato de linalilo,  $\alpha$ -terpineol, citronelol, acetato de geranilo, N-metil antranilato de metilo, entre otros. Cuando se hizo la identificación del componente principal de estos cítricos lo llevó a cabo mediante cromatografía de gases, se determinó que más del 90% del aceite de *C. reticulata* lo compone el limoneno el cual presenta una gran capacidad inhibitoria de crecimiento bacteriano en los alimentos, principalmente sobre las bacterias Gram positivas (Kimball, 2002: 125). Aunque la información publicada acerca de la composición química del aceite esencial extraído del flavedo de la mandarina no es conocida (Giacomo y Retamar, 1987: 142).

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de los componentes del aceite de *C. reticulata*, se sabe que posiblemente los sitios de acción en la célula bacteriana incluya a la membrana celular, pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético, todos ellos estratégicos para la supervivencia de los microorganismos y cualquier acción sobre ellos puede inactivar a la célula microbiana (Albado, 2001:18). La acción de estos compuestos se basa principalmente en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales. Una vez que el compuesto fenólico cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y con las proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así a la actividad celular (Conner, 1993: 443). Mencionándose que los sitios de ataque dentro de las células microbianas dependen de las concentraciones utilizadas en los alimentos, pudiendo causar inhibición o inactivación de los microorganismos (Stashenko, 2007: 592).

## V. CONCLUSIONES

Los cultivos de *S. aureus* y *P. aeruginosa* evaluados son sensibles a las diferentes concentraciones ensayadas del aceite esencial obtenido de *C. reticulata* var. Satsuma “mandarina” *in vitro*.

El aceite esencial puro obtenido de *C. reticulata* var. Satsuma “mandarina” es significativamente más eficaz contra *S. aureus* que las otras concentraciones y que Vancomicina (Control); y más eficaz contra *P. aeruginosa* que las otras concentraciones evaluadas, pero menos eficaz que Ciprofloxacina (Control).

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, M., GONZÁLEZ, M., ARAQUE, M., VELAZCO, E., KHOURI, N., ROJAS, L., USUBILLAGA, A. 2003. **Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. *varbasilicum*, *O. basilicum* L. *varpurpurens*, *O.***

- gratissimum, L. y O. tenuiflorum, y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multiresistentes de origen nosocomial.** Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Revista de la Facultad de Farmacia; 45 (1): 19-24.
- AKGUL, A., KIVANC. M. 1988. **Inhibitory effect of six Turkish thyme-like spices on some emmon food-borne bacteria.** Die Nahrung; 32 (2): 201-203.
- ALBADO P, SAEZ E, ATAUCUSI, G. 2001. **Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano).** Rev Med Hered; 12 (1):16-19.
- BERGONZELLE, E., DONNICOLA, D., PORTA, N., CORTÉIS, E. 2003. **Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection.** Journal Antimicrob Agents Chemother; 47(10): 3240-3246.
- BRACK A, HEINZ P. 2002. **Perú Maravilloso.** Edit. Epenza: 25-45
- CÁCERES A. 1996. **Plantas de uso medicinal en Guatemala.** Editorial Universitario. Universidad de San Carlos de Guatemala: 150-155, 228-230, 283-286.
- CARRILLO I. **Efecto de la actividad de agua, pH y temperatura de incubación en la capacidad antimicótica de mezclas de benzoato de sodio-vainilla.** UDLAP, 1999
- CONNER, D., BEUCHAT, L. 1984. **Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts.** J. food Sci; 49: 429-434.
- CONNER, D. 1993. **Naturally occurring compounds, Antimicrobials in foods.** New York: 441-468.
- DELLACASA, A., DUSCHATZHY, C., BAILAC, P., CARRASCULL, A., PONZI, M. 1999. **Propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Heterotheca latifolia* Buck (Compositae).** J. Essent. Oil Res.11: 262-263.
- DEMO, M., OLIVIA, D., LÓPEZ, L., ZUNINO, P., ZYGADLA, J. 2005. **Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina.** Pharmaceut Biol. Argentina. 43 (2): 129-134.
- DINGES, M., ORWIN, P., SCHLIEVERT, P. 2000. **Exotoxins of *S. aureus*.** Clinical Microbiology Reviews. 13: 16-34
- GARCÍA, R. **Microorganismos de los alimentos. Su significado, métodos de enumeración.** 2da ed. Edit. Acribia S.A. 2000: 48.
- GIACOMO, A., RETAMAR, J. 1987. **Aceites esenciales de especies vegetales: Biodiversidad de sus productos químicos.** IPNAVS. Argentina. 1: 149-162.
- HUANG, C., LIN, T., WANG, CH. 2002. **Community acquired *P. aeruginosa* sepsis in previously healthy infants and children: analysis of forty-three episodes.** Pediatr Infect Dis J.; 21: 1049-52.
- JENSEN, A., WACHMANN, C., POULSEN, K., ESPERSE, F., SCHEIBEL, J., SKINHOJ, P. et al. 1999. **Risk factor for hospital-acquired *S. aureus* bacteremia.** Arch Intern Med.; 159: 1437-1444.
- KALEMBA, D., KUNICKA, A. 2003. **Antibacterial and antifungal properties of essential oils.** Current Medicinal Chemistry. Poland.10: 813-829
- 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.

- KIMBALL, D. 2002. **Procesado de cítricos**. Edit. Acibia S.A. España. p. 234.
- LAMBERT, R., SKANDAMIS, P., COOTE, P., NYCHAS, G. 2001. **A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol**. J Appl Microbiol, (91): 453-462
- LEAL, A. 1997. **Mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo**. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- LÓPEZ, J., GAGNON, H., COLLIN, G., PICHETTE, A. 2005. **Essent oil res**. 17: 1-7.
- LOWY, F. 1998. ***Staphylococcus aureus* infections**. N Engl J Med; 339: 520-532.
- LOZANO, A., LOARCA, G., LECONA, S., MEJÍA, E. 2005. **El orégano: Propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN). 4: 14-24.
- MARTÍNEZ, J., SULBARAN, B., OJEDA, G., y cols. 2005. **Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina**. Rev. Fac. Agron. 20 (4): 502-512.
- MARTÍNEZ, M. 2001. **Aceites Esenciales**. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín. Universidad de Antioquía. 1-12.
- MARTÍNEZ, M. 2009. **Morfología y estructura bacteriana**. Bogotá.
- MAZARIEGOS, J. 2008. **Identificación y cuantificación de los componentes principales del aceite esencial del flavedo (cáscara) de *Citrus reshni* (Mandarina Cleopatra), *C. reticulata* (Mandarina común) y *C. reticulata* Blanco o *C. tangerina* (Mandarina Dancy) por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**. Para optar al título de QUÍMICO. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 117.
- MORALES, V. 1996. **Extracción y caracterización del aceite esencial de Lima Thaití *Citrus aurantifolia* (Chritms) Swingle**. Trabajo especial de Grado. LUZ. Facultad Experimental de Ciencias, Maracaibo, Venezuela.18-19.
- OUSSALAH, M., CAILLET, S, LACROIX, M. 2006. **Mechanism of action of spanish oregano, chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes***. J. Food Prot.; 69 (5): 1046-1055
- OUSSALAH, M., CAILLET, E., SAUCIER, E., LACROIX, L. 2005. **Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimutium*, *S. aureus* and *L. monocytogenes***. Canadá. 414-420.
- PÉREZ, T. 2006. **Efectividad de los vapores de aceites de tomillo y orégano como agentes antibacterianos**. Tesis de maestría. Universidad de las Américas. Puebla, México.
- RHAYOUR, K., BOUCHIKHI, T., TANTAOU, E., SENDIDE, K., REMMAL, A. 2003. **The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *E. coli* and *B. subtilis***. JEOR. 15 (5): 356-362.
- SMITH, P., STEWART, J., 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.
- SOBERÓN, G. 2007. ***Pseudomona aeruginosa***. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

- STASHENKO, E. 2007. **Comparación de la composición y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae.** Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. (105): 579-596.
- TAKARADA, K., KIMIZUKA, R., TAKAHASHI, N., HONMA, K., OKUDA, K., KATO, T. 2004. **A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens.** Oral Microbiol Immunol. 19(1):61-4.
- ULTEE, A., BENNIK, M., MOEZELAAR, R. 2002. **The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food bome pathogen *B. cereus*.** Applied and environmental microbiology. 1561-1568.
- WALLACE, J. 2004. **Antimicrobial propeties of plant secondary metabolites.** Symposium on Plants as animal foods: a case of catch 22.