



Artículo Original

Sensibilidad de *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii* frente al aceite esencial de *Cocos nucifera*

Sensitivity of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* against *Cocos nucifera* essential oil

Marylin Escalante-Pereda¹ y Pedro Mercado-Martínez²

¹Tesista Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

Se determinó la sensibilidad de *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii* frente a cinco diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cocos nucifera*. El aceite se obtuvo por el método de destilación por arrastre con vapor de agua y, para determinar la sensibilidad antibacteriana, se emplearon cultivos de *L. monocytogenes* y de *L. ivanovii* los cuales fueron reactivados en Caldo Frasier por 18 horas a 37°C y estandarizadas al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 ufc/mL). La actividad antibacteriana del aceite se determinó utilizando técnica de difusión en Agar en placa de Mueller-Hinton temperado a 45°C y las concentraciones del aceite al: 20%, 40%, 60%, 80% y 100%; asimismo, el antibiótico sulfametoxazol/trimetoprim como control positivo). La actividad antibacteriana se determinó midiendo el halo de inhibición alrededor de cada orificio: se consideró inhibitorio un valor de 2mm. Se encontró que todas las cepas de *L. monocytogenes* y *L. ivannovii* presentaron sensibilidad frente a las cinco concentraciones empleadas del aceite esencial de *C. nucifera* ($p < 0,05$).

Palabras clave: Sensibilidad bacteriana, aceite esencial, *Cocos nucifera*, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

The sensitivity of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* against five different concentrations of the essential oil of *Cocos nucifera* was determined. The oil was obtained by the method of stripping steam and for antibacterial sensitivity, cultures of *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* were used which were reactivated Frasier Broth for 18 hours at 37 ° C and standardized to the tube No. 0.5 of the Mac Farland Nephelometer (1.5×10^8 cfu/mL). The antibacterial activity was determined using oil diffusion method on agar plate of Mueller-Hinton tempered to 45°C and the following oil concentrations: 20%, 40%, 60%, 80% and 100% of oil, also sulfamethoxazole/trimethoprim (antibiotic) as a positive control). The antibacterial activity was determined by measuring the inhibition zone around each hole: a value of 2mm it was considered inhibitory. It was found that all strains of *L. monocytogenes* and *L. ivannovii* showed sensitivity to the five concentrations used the essential oil of *C. nucifera* ($p < 0,05$).

Keywords: Bacterial sensitivity, essential oil, *Cocos nucifera*, *Listeria monocytogenes*.

INTRODUCCIÓN

El alarmante incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos es, sin duda, uno de los mayores problemas actuales de salud pública ya que estos compuestos constituyen una de las principales herramientas para controlar y tratar las infecciones bacterianas, tanto en medicina humana como en veterinaria^{1,2,3}. Como consecuencia de ello, en los últimos 20 años ha crecido el interés acerca de las plantas medicinales y sus aceites esenciales (compuestos aromáticos producidos por varios géneros de plantas que poseen actividad biológica) y/o extractos de vegetales con actividad antifúngica y antibactericida^{4,5}

El cocotero o árbol de coco (*Cocos nucifera*), conocido como “el árbol de la vida” es cultivado por sus diversas utilidades reconocidas para la nutrición y la medicina. El fruto es una drupa dura, formado por una epidermis lisa, un mesocarpo espeso, más al interior se encuentra el endocarpo que es una capa fina y dura de color marrón llamada hueso o concha y envuelto por él se encuentra la copra o almendra que forma una cavidad donde se aloja el agua⁶.

La capacidad antimicrobiana del cocotero ha sido probada contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* y *Salmonella*^{7,8}. Ello se debe a que el aceite es rico en ácido láurico, el cual se convierte en monolaurina, un compuesto que es muy tóxico para las bacterias, debido a su capacidad para alterar sus membranas lipídicas y virtualmente destruirlos⁹.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) se han incrementado en las últimas décadas a nivel global y *Listeria* aparece como uno de los microorganismos más frecuentemente transmitidos por el consumo de alimentos carentes de preparación adecuada: *L. monocytogenes* es la bacteria con mayor índice de muertes en seres humanos que consumen alimentos contaminados por microorganismos, aproximadamente se registran 2500 casos de listeriosis humana por año, incluyendo 500 muertes^{9,10,11,12,13}. Por tratarse de una bacteria psicrófila, en los alimentos contaminados almacenados en frío no es inhibido su crecimiento. Crecen en el rango de temperatura entre -0,4°C y 50°C, con una actividad de agua mínima entre 0,9 y 0,97 y, son capaces de crecer en el intervalo de pH desde 4,1 hasta alrededor de 9,6; son tolerantes a la sal, crecen a elevadas concentraciones de NaCl¹³. Por tanto éste microorganismo puede adaptarse para sobrevivir, crecer en una gran variedad de condiciones ambientales y causar listeriosis¹⁴.

En los alimentos, *L. monocytogenes* suele ser eliminada mediante la cocción o la pasteurización. Se puede reducir la población bacteriana en los productos alimenticios mediante la exposición a ozono, dióxido de cloro, fosfato trisódico clorado, o ácido peroxiacético, como así también ácido láctico al 1.5 % con peróxido de hidrógeno al 1.5 % durante 15 minutos a 40 °C; también se puede reducir la contaminación mediante una combinación de pH 10.5 y cloruro de sodio al 10 % junto con otros ingredientes como monolaurina o ácido láurico¹⁵.

Teniendo en cuenta que en el Perú se cultiva *Cocos nucifera*¹⁶ y que no se han reportado estudios sobre el efecto del aceite extraído de ésta planta sobre diferentes microorganismos patógenos, se pretende obtener el aceite esencial del coco, que contiene el ácido láurico, para evaluar su actividad antimicrobiana frente a dos microorganismos causantes de ETAs: *Listeria monocytogenes* y *L. ivannovii*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

- Doce cultivos de *Listeria monocytogenes* y doce cultivos de *L. ivannovii* proporcionados por el Laboratorio de Fisiología y Genética Bacteriana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo (Perú).

Treinta unidades de *Cocos nucifera*, obtenidos del mercado “La Hermelinda”. (Trujillo, Perú).

Obtención del extracto de aceite esencial *Coco nucifera*^{17,18,19}

Los cocos fueron pelados para separar la cáscara amarilla y la costra café que protegen la parte interior del coco (copra) que se utilizó para la producción del aceite esencial. Luego, se hicieron lavados con agua potable a chorro y se seleccionaron aquellas copras que no estén muy humedecidas y que no presenten descomposición o magulladuras profundas. Entonces, las copras fueron ralladas con un rallador de acero inoxidable estéril.

Las copras de coco ralladas (40gr) se maceraron con hexano (60ml) en un vaso de precipitado de 250ml por dos horas, luego se hizo la destilación; la carga líquida se hirvió lentamente y los vapores se extrajeron con la misma rapidez con la que se formaron; luego se envió a un condensador donde se recolectó el vapor condensado (hexano).

Finalmente, el aceite fue envasado en frascos de color ámbar de 12 ml de capacidad y conservado en refrigeración a 4 °C.

Preparación de los inóculos bacterianos

Obtención de los Cultivos bacterianos

Los 24 cultivos bacterianos se reactivaron cultivándolos en Caldo Frasier por 18 horas a 37°C, para posteriormente ser sembrados en agar.

Estandarización de los inóculos bacterianos

Del agar, se tomó una pequeña cantidad de colonias, para luego ser suspendidas en solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar la turbidez equivalente al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 ufc/mL).

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, 80 y 100% de aceite esencial de coco; utilizando como solvente etanol absoluto. Se tuvo en cuenta que las concentraciones de aceite preparadas no estuvieran en contacto con la luz, debido a que es fotosensible.

Prueba de Sensibilidad¹⁸

La actividad antibacteriana del aceite esencial Cocos nucifera se determinó utilizando los cultivos bacterianos, siguiendo la técnica de difusión en Agar en placas, por triplicado. Las placas contenían de 22 a 25 ml de agar Mueller-Hinton temperado a 45°C inoculado con una suspensión de cultivo joven bacteriano (en fase exponencial de crecimiento) a la concentración de 1.5×10^8 ufc/mL (previamente estandarizado). A cada placa se le realizó 5 orificios de 4mm de diámetro cada uno utilizando un sacabocado estéril. A estos orificios se le añadió 50 uL de cada una de las concentraciones del aceite esencial. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. La actividad antibacteriana del aceite esencial se determinó midiendo el halo de inhibición alrededor de cada orificio; el tamaño de ésta zona de inhibición indicó que las bacterias objeto de análisis presentaron sensibilidad frente a las disoluciones de dicho aceite (se considera inhibitorio un valor de 2mm).

También se realizó una placa control: Para *L. monocytogenes* y *L. ivannovii* se utilizó el antibiótico sulfametoxazol.+ trimetropin.

RESULTADOS

Se observó que en todas las concentraciones, *L. monocytogenes* presenta sensibilidad al aceite esencial; habiendo mayor diferencia significativa entre las concentraciones de 80% y 100% (Fig. 1). La Fig. 2 muestra el promedio de la medición de los halos de sensibilidad de los cultivos de *L. ivannovii* a las concentraciones de 20%, 40%, 60%, 80% y 100% y, se observa que en todas las concentraciones, *L. ivannovii*, presenta sensibilidad al aceite esencial; habiendo mayor diferencia significativa entre las concentraciones de 80% y 100%. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre la sensibilidad de los 12 cultivos de *L. monocytogenes* y los 12 de *L. ivannovii*, frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial de Cocos nucifera (Fig, 3).

DISCUSIÓN

La extracción de los metabolitos esenciales de vegetales de importancia en salud pública, han originado un vertiginoso estudio de sus características en cuanto a la antibiosis de microorganismos patógenos^{14,16,19}. En el presente estudio se investigó la sensibilidad ejercida por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *C. nucifera* sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* y *L. ivannovii*.

En recientes estudios se ha demostrado la actividad antibacteriana de diversos aceites esenciales, aunque poco se sabe acerca de los mecanismos de acción antimicrobiana de los compuestos mayoritarios de algunas especies, como la naranja, clavo de olor, canela, coco, torongil y otros cítricos, ya sea de forma individual o como parte del aceite esencial completo^{20,21,22}

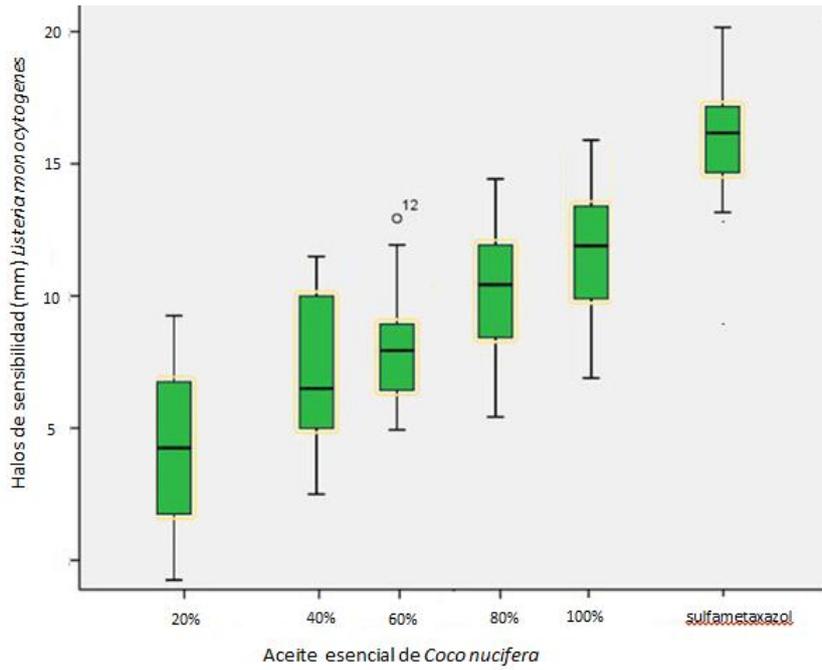


Fig. 1: Variación del promedio de los halos de sensibilidad (mm) de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cocos nucifera*. ($p < 0.05$).

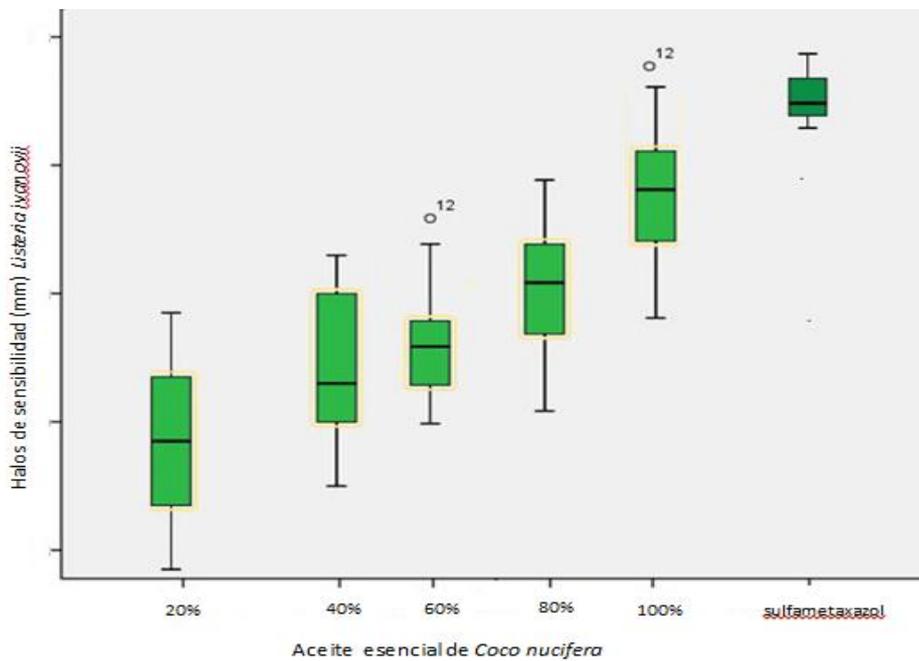


Fig. 2: Variación del promedio de los halos de sensibilidad (mm) de *Listeria ivanovii* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cocos nucifera*. * $p < 0,05$.

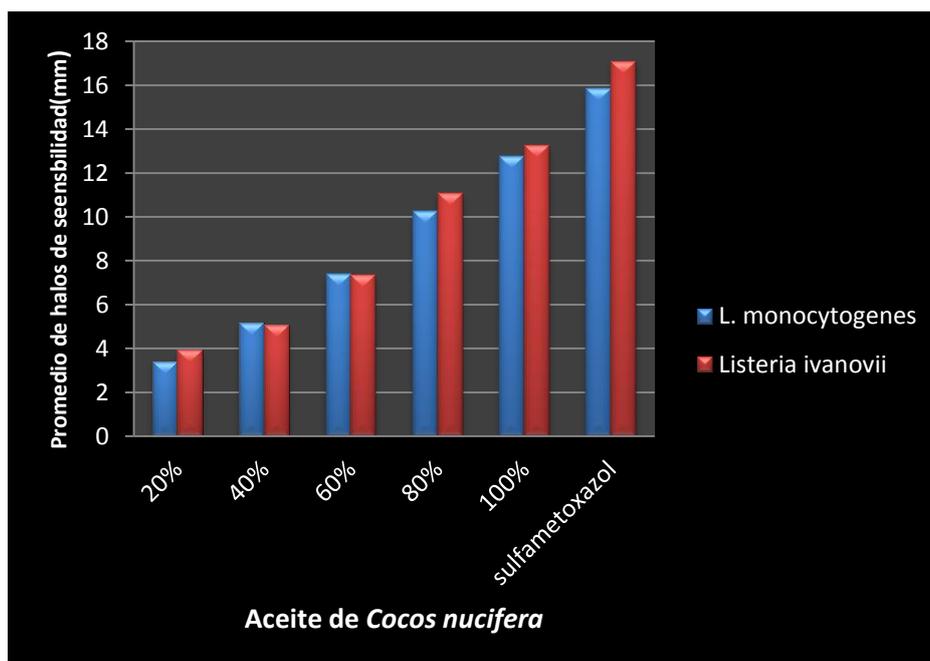


Fig. 3: Comparación de promedios de los halos de sensibilidad (mm) de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria ivanovii* frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cocos nucifera* ($p > 0,05$). *No existe diferencia significativa entre los grupos de *L. monocytogenes* y de *L. ivanovii* ($p > 0,05$) frente a un mismo porcentaje del aceite esencial de *C. nucifera*.

La sensibilidad ejercida por el aceite esencial extraído con el método de arrastre con vapor, ya sea puro o diluido con etanol al 99.99%, fue del tipo bactericida a todas las concentraciones. Dicha actividad se observó por la presencia de halos transparentes mayores de 2.33 mm alrededor de cada orificio en las placas utilizadas en el ensayo. En los resultados obtenidos se muestra que tanto *L. monocytogenes* como *L. ivanovii*, son sensibles al aceite de coco formando halos de inhibición con diámetros entre 3,41 a 12,71 mm y 3,9 a 13,25 mm.

Respecto de la medida del halo de sensibilidad de *L. monocytogenes* en agar Mueller Hinton, se pudo apreciar que a mayor concentración de aceite esencial se obtuvo un mayor halo y un menor crecimiento de la bacteria durante las 24 horas de incubación a 37 °C., también se demuestra que esta bacteria no presenta una resistencia frente a la acción del aceite de *Cocos nucifera*, desde la mínima concentración utilizada (20%) hasta la concentración más alta empleada (100%). Los halos de sensibilidad, oscilan entre promedios de 3 a 14 mm, respectivamente, en comparación con el halo de sensibilidad formado por el antibiótico sulfametaxol - trimetropin (control) que fue de 15.83mm. A partir de la concentración de 80%, se evidenció una mayor sensibilidad que, según la referencias, debe sobrepasar los 10.5mm^{22,23,24}. Se observa también que los halos de sensibilidad formados en todas las concentraciones del aceite esencial, respecto al halo de sensibilidad formado por sulfametaxol-trimetropin, presentan $p < 0,05$, lo que significa que existe diferencia significativa entre la eficacia de estos resultados.

L. ivanovii no muestra una resistencia frente a la acción del aceite de coco, desde la mínima concentración utilizada (20%) hasta la concentración más alta empleada (100%). Los halos de sensibilidad, oscilan entre promedios de 4 a 14 mm respectivamente, en comparación con el halo de sensibilidad formado por el antibiótico sulfametaxol - trimetropin (control) que fue de 17,08mm. A partir de la concentración de 80%, se evidenció una mayor sensibilidad que, según la referencias, debe sobrepasar los 11.5mm^{15,19,24,25}. Se observa también que los halos de sensibilidad formados a todas las concentraciones del aceite esencial, respecto al halo de sensibilidad formado por sulfametaxol-trimetropin, presentan $p < 0,05$, lo que significa que existe diferencia significativa entre la eficacia de estos resultados.

La comparación de los promedios de los halos de inhibición de cada concentración de aceite presentado de la dos especies, observándose que en todas sus concentraciones *L. ivannovii* presenta mayor sensibilidad en comparación con *L. monocytogenes*. Se refleja que tanto *L. monocytogenes* como *L.*

ivanovii no presentan una marcada diferencia en cuanto a la sensibilidad como especies, es decir que ambas, al haber sido tratadas con las distintas concentraciones del aceite esencial, son casi igual de sensibles frente a dicho aceite.

Para evidenciar la actividad antimicrobiana del etanol al 99.9% fue necesario utilizar el método de difusión en agar, la cual se mostró inactiva y no tuvo inhibición pues no hubo presencia de halos transparentes en ninguna de las cepas analizadas, mostrando la resistencia de estos microorganismos al disolvente, no obstante al realizar el antibiograma con el antibiótico sulfametaxol-trimetropin de 30 µg se originaron halos con diámetro promedio de 15.8333 mm, siendo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* sensibles al microorganismo.

La cepa utilizada para determinar la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar fue *Listeria monocytogenes*, los resultados presentaron halos de inhibición de 9.33-10.5 mm de diámetro en las concentraciones de 100 y 90%. A las concentraciones de 80%, 70%, 60% y 50% los halos fueron de 6.41-8.8mm y a concentraciones menores los halos fueron de 4 mm^{23,25}. Los resultados reportados en este estudio difieren de los resultados encontrados para *C. nucifera*. Las de 80% y 100% de concentración de aceite, en la cual se obtuvo la mayor difusión del aceite, con una medida promedio de halo de 11.1mm en los cultivos analizados.

La sensibilidad del microorganismo al aceite esencial se relaciona con el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. Según el diámetro del halo de inhibición, los microorganismos se clasifican en: no sensibles ($d < 8$ mm.), sensibles ($9 \text{ mm.} < d < 14$ mm.), muy sensibles ($14 \text{ mm.} < d < 19$ mm.) y extremadamente sensibles ($d > 20$ mm.)³⁴De acuerdo a esta referencia bibliográfica, y basándose en los resultados del diámetro del halo de crecimiento, *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii*, fueron sensibles al aceite esencial a las concentraciones de 80% en los 24 cultivos, con un diámetro de 10.41-10.92 mm. También se evidenció que *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* no son sensibles al control negativo, etanol absoluto, ya que no se observó la formación de halos, mostrando la resistencia de estos microorganismos al disolvente. Se concluye, entonces, que (i) conforme se va incrementando la concentración del aceite de *C. nucifera*, se va evidenciando una mayor actividad antibacteriana frente al crecimiento, tanto para *L. monocytogenes* como para *L. ivanovii*, y (ii) existe diferencia significativa entre la sensibilidad de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* frente al aceite esencial de *C. nucifera*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad Antimicótica in vitro y Metabolitos del Aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Muña). Rev Peru Med Exp y Salud Pública. 2007; 2 (25): 23-25
2. AOCS. Official methods of analysis of AOCS (American Oil Chemists' Society). 2nd ed. Official methods Cs 10c-95 Apparent density, Cd 3d-63 Acidity, Cs 7-25 Refractive index. USA. 2009.
3. Torres C. La resistencia bacteriana a los antibióticos: siete décadas después de Fleming (Discurso leído en el acto de su recepción académica), Edit. Cometa S.A., Zaragoza, 2012; pp.15-20.
4. García A, Morón F, Carbonell A, López P, Ruiz A. Estrategia para lograr un uso racional de los medicamentos herbarios, Rev. Cubana Plant Med 2005; 10(2): 19-26
5. Montes R, García R. Eficiencia de extractos vegetales para el control de *Alternaria solani* en jitomate. Fitopatología 1999; 29(1): 55.
6. Manisha D, Shyamapada M. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention; Asian Pacific J Trop Medicine 2011; pp.241-247.
7. Borezee E, Pellegrini E, Berche P. OppA of *Listeria monocytogenes*, an Ologopeptide-Binding Protein Required for Bacterial Growth at Low Temperature and Involved in Intracellular Survival. Infec & Immun. 2000; 68: 7068-7077.
8. Rodríguez L. Ácidos Carboxílicos Naturales. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2013.
9. Buchanan R, Lindqvist R, Ross T. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Disponible en: <http://www.fao.org/es/esn>.
10. Blackburn C, MacClure P. Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control. Boca Ratón, CRC, 2002.
11. Jalali M, Abedi D. Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. PubMed. 2008, 122(3):336-40.
12. Molina N, Mercado R, Carrascal. Efecto del tiempo y temperatura de cocción en hamburguesas y longanizas inoculada artificialmente con *Listeria monocytogenes*. Bistua. 2006; 8(1):31-42.
13. Callejo R, Prieto M, Martínez C, Aguerre L. Aislamiento, identificación y caracterización de *Listeria monocytogenes*. : <http://www.whoglobal.salmsurv.com/a.n.l.i.s./bacteriología>

14. Nychas G. Natural antimicrobials from plants. Inc. New methods of foods preservatives. Glasgow: Edit. Gould, Gw Blackie Academic and Professional. 1995.
15. Cáceres C, Morales L, Girón M. Demostración de la actividad antimicrobiana de algunas especies vegetales usadas popularmente como medicinales en la cuenca del Caribe. Ciencia y Tecnología 1990; pp.81-87
16. Soza J. Aprovechamiento Integral del Coco para la obtención de Aceite y biodiesel. Edit. Universidad Nacional De Ingeniería. Nicaragua, 2003. 10 (2): 125-132.
17. López A. Extracción y Caracterización de los Aceites Esenciales de las Cortezas de Mandarina y Limón. [Tesis para obtener el título de Ingeniería Agroindustrial].Escuela Politécnica Nacional. Quito.2006, pp. 36-37.
18. Thuille N. Bactericidal activity of herbal extracts. INT. J. Hyg Environ Health, 2003; 206: 1-5.
19. García R. Microorganismos de los alimentos. Su significado, métodos de enumeración. México, DF: Edit. Acribia S.A. 2000.
20. Ccahuana R, Solfo S. Antimicrobial activity of *Cocos nucifera* against oral human pathogens. Braz Oral Res. 2007; 21(1):46-50.
21. Martínez J, Sulbarán B, Ojeda G, Ferrer A, Nava R. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. Rev Fac Agron. 2003; 502- 512.
22. Ponce A, Roura S, Del Valle C, Moreira M. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: in vitro and in vivo Studies. Postharvest Biol & Technol. 2008; 49. 294-300.
23. Fremont Y, Ziller R, Lamothe M. El Cocotero, Colección de Agricultura. Lima, Perú: Tropical, Editorial Blume, 1969.
24. Soza J. Aprovechamiento Integral del Coco para la obtención de Aceite y biodiesel. Edit. Universidad Nacional De Ingeniería. Nicaragua, 2011. 14-17.
25. Food and drug administration (FDA). 2005. Bacteriological Analytical Manual 9th Edition, AOAC Int. Publishers Arlington V.A.

Correspondencia: Pedro Mercado Martínez. Email: pmercado@unitru.edu.pe
