

REBIOL

REVISTA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA



Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional de Trujillo

Volumen 36, Número 1

Enero - Junio, 2016



ISSN: 2313-3171(En Línea)

La Medicina Darwiniana, nuevo enfoque científico

Registrado con el ISBN-13: 978-3-659-05762-5, el ISBN-10: 3659057622 y el EAN: 9783659057625, aparece el libro titulado: **La Medicina Darwiniana, nuevo enfoque científico**, cuyo autor es el Dr. **Pedro Mercado Martínez** del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo (Trujillo, Perú).

El libro está basado en la Tesis Doctoral: “La Medicina Darwiniana como teoría científica dentro del campo de la teoría de la Selección Natural”, que mereció un premio como **Única Mención Honrosa** en el II concurso de tesis de Postgrado a nivel nacional organizado por la Asamblea Nacional de Rectores-Perú-2008. Plantea que la Medicina Darwiniana debe ser considerada como teoría científica para lo cual hace una revisión sobre la ciencia y el método científico, analiza algunas teorías aplicadas a la ciencia y define y caracteriza a la pseudociencia. La metodología usada consta de métodos y técnicas para medir su nivel de científicidad mediante evidencias científicas y aplicando técnicas conceptuales. Como resultado se plantea la axiomatización de la Medicina Darwiniana mediante hipótesis, teoremas y criterios epistemológicos basados en el método hipotético-deductivo. Estos resultados hacen concluir que para la Medicina Darwiniana: sus axiomas y teoremas tienen nivel de científicidad; sus entidades y términos teóricos, desideratas básicas y requisitos formales, acreditan su nivel de científicidad y se contrasta como teoría científica.

De las 33 hipótesis que se plantean resaltan las siguientes: (i) la obesidad está representando un cambio evolutivo altamente peligroso para el cuerpo humano, (ii) la menstruación es una respuesta de defensa, (iii) el dolor forma parte de la defensa y no del ataque, (iv) los organismos simplistas no envejecen, no les da tiempo para envejecer, (v) la tos, como mecanismo de defensa, ha sido cuidadosamente seleccionada y perfeccionada a través de millones y millones de años, (vi) en muchas ocasiones puede ser perjudicial reducir la fiebre de un enfermo; pues, puede estar actuando como mecanismo de defensa, (vii) un nivel reducido de hierro en sangre (anemia), en algunas infecciones bacterianas, es otro mecanismo evolutivo de defensa, (viii) el cáncer, se manifiesta al igual que en un proceso evolutivo y debe ser analizado desde una concepción evolutiva, (ix) los síntomas producidos en la diarrea por *Shigella*, no es parte del ataque sino es una defensa intestinal, (x) los virus de la rabia, a lo largo de la evolución, han ido seleccionando su habilidad de ataque, (xi) los virus son consecuencia de la degradación de microorganismos, que alguna vez fueron parásitos obligados de otras células y son el equivalente a genes vagabundo, (xii) algunos virus están más preparados para la vida que otros, (xiii) las bacterias han evolucionado a través de cientos de millones de años y han mutado para evadir los ataques del sistema inmune y de los antibióticos y (xiv) algunos parásitos no “confían” en la estabilidad de nuestro organismo y buscan un intermediario o vector.

El libro ha sido editado por la Editorial Academia Española y la Website es: <https://www.eae-publishing.com/>. Desde esta tribuna felicitamos al colega Pedro Mercado y le ofrecemos, con agrado, las páginas de esta revista para que trate en detalle algunos tópicos del libro u otros.

Foto de la portada: Flor del “Algodón nativo” *Gossypium* sp. variedad de fibra verde, Familia: Malvaceae, Genero: *Gossypium* L.. Foto tomada por Armando Efraín Gil Rivero y Segundo Eloy López Medina.

El Editor

REBIOL

Volumen N° 36, Número 1, Enero-Junio, 2016

Contenido/Contents

ARTÍCULOS ORIGINALES/ORIGINAL PAPERS

- **Frecuencia de Grupos Sanguíneos ABO y del Factor Rh en la Comunidad Nativa de Supayaku (Cajamarca, Perú).** Frequency of ABO Blood Group and Rh factor in the Native Community of Supayaku (Cajamarca, Peru). José L. Polo Corro, Heraclio F. Castillo Picón y Segundo I. Ponte Valverde..... Pág. 5
- **Efecto de las concentraciones del surfactante Polioxietileno (20) Monooleato de sorbitán "Tween 80" en la biodegradación de petróleo Diesel II en suelo por *Pseudomonas aeruginosa*.** Effect of the concentrations of surfactant Polyoxyethylene (20) Sorbitan monooleate "Tween 80" on Diesel II oil biodegradation in soil by *Pseudomonas aeruginosa*. Diana Periche Fiestas y Heber Robles Castillo. Pág. 10
- **Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos.** Isolation and selection of cellulolytic bacteria from compost organic waste. Luis A. Rodríguez Silva y Luis Llenque Díaz..... Pág. 19
- **Efecto del aceite esencial de *Lantana camara* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.** Effect of *Lantana camara* essential oil on growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Alan Venegas del Castillo y María N. Vásquez-Valles..... Pág. 29
- **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-Pereda y Pedro Mercado-Martínez Pág. 38
- **Actividad antibacteriana in vitro de las nanopartículas del rizoma de *Curcuma longa* sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1.** In vitro antibacterial activity of nanoparticles of *Curcuma longa* on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1. Javier Arica-Pajares, Ana León-Matos, Jersson Ascate-Lezama y Julio Arellano..... Pág. 45
- **Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos y ninfas de *Oligonychus* sp. en condiciones de laboratorio.** Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on adults and nymphs of *Oligonychus* sp. under laboratory conditions. Johnny Huanes-Carranza y Juan Wilson-Krugg..... Pág. 51

- **Efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de *Piper aduncum* sobre la supervivencia de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.** In vitro effect of hydro-alcoholic extract of *Piper aduncum* on the survival of *Trypanosoma cruzi*-tripomastigotes. Lucía Avalos, Guillermo Delgado, Jensen González, Carlos Luján y Hermes Escalante Pág. 59
- **Efecto del aceite esencial de los frutos y semillas de *Pimpinella anisum* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.** Effect of essential oil of fruits and seeds of *Pimpinella anisum* on the growth of *Staphylococcus aureus*. Olenka Leytón¹, Jaquelin Saavedra¹, Katerin Segura¹, Leticia Solorzano¹ y Orlando Pretell..... Pág. 65

POLITICA EDITORIAL

- Guía para los autores. Pág. 69



Frecuencia de Grupos Sanguíneos ABO y del Factor Rh en la Comunidad Nativa de Supayaku (Cajamarca, Perú)

Frequency of ABO Blood Group and Rh factor in the Native Community of Supayaku (Cajamarca, Peru)

José L. Polo Corro¹, Heraclio F. Castillo Picón² y Segundo I. Ponte Valverde³.

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo, Perú. ²Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo (UNASAM). Huaraz, Perú. ³Facultad de Ciencias, Universidad Privada del Norte. (UNP) Lima. Perú.

RESUMEN

El conocimiento de la composición de grupos sanguíneos ABO y del factor Rh en poblaciones alejadas a la atención primaria de salud resultan claves, sobre todo en casos de emergencias en las que se tiene que acudir a transfusiones sanguíneas. A partir de la descripción y caracterización de los grupos sanguíneos ABO y factor Rh se ha podido definir su distribución en la población de la Comunidad Nativa de Supayaku (distrito de Huarango, Cajamarca, Perú) en octubre del 2013; la Comunidad presenta 220 habitantes y el estudio se llevó a cabo en una muestra poblacional de 30, que corresponde a quienes accedieron a participar voluntariamente. Se encontró que el 100% de los nativos examinados pertenecen al grupo sanguíneo O y son Rh+.

Palabras clave: grupos sanguíneos, factor sanguíneo, comunidad nativa, antígenos y anticuerpos.

ABSTRACT

Knowledge of the composition ABO blood group and Rh factor in remote primary health care are key populations, especially in emergencies where you have to resort to blood transfusions. From the description and characterization of blood groups ABO and Rh factor is able to define their distribution in the population of the Native Community of Supayaku (Huarango district, Cajamarca, Peru) in October 2013; Community has 220 inhabitants and the study was conducted in a sample of 30, which corresponds to who agreed to participate voluntarily. It was found that 100% of native examined belong to O blood type and are Rh +.

Keywords: blood group, blood factor, native community, antigens and antibodies.

INTRODUCCIÓN

EL sistema de grupo sanguíneo ABO es uno de los sistemas de grupo sanguíneo más importante para una práctica segura de transfusión de sangre, debido a que las proporciones relativas a dichos grupos sanguíneos varían ampliamente en las distintas poblaciones; por ello, las cifras de frecuencia sólo son válidas para un población específica en que se han determinado¹⁴.

El Estado Peruano se encarga de albergar una de las mayores riquezas etnoculturales del continente americano y el mundo; en referencia a ello, el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI)⁷ concluye que un tercio de la población peruana es indígena y que la Amazonía es la región que posee la mayor diversidad de los grupos indígenas del país. La ley de Comunidades Nativas y de Desarrollo Agrario de Selva y Ceja de Selva (D.L. N° 22175), en su artículo 8°, define a la Comunidad Nativa como una organización que tiene origen en grupos tribales de la selva y ceja de selva y que están constituidas por conjuntos de familias vinculadas por el idioma o dialecto, caracteres culturales y sociales, tenencia y usufructo común y permanente de un mismo territorio, con asentamiento nucleado disperso¹².

Los grupos sanguíneos se heredan bajo procesos y leyes genéticas, los cuales son determinados por procesos y leyes sociales, en especial los que se refieren a las relaciones entre clases y etnias, por lo que es fundamental tener claro el proceso de formación y la estructura de tales clases y etnias en diferentes momentos históricos si se quiere entender por qué la distribución de frecuencias de los grupos sanguíneos es de una forma y otra forma⁴.

Probablemente por su difícil acceso, los estudios sobre frecuencia de grupos sanguíneos ABO y Rh en el Perú, sus regiones y etnias son escasos y en la Comunidad Nativa de Supayaku no se han efectuado este tipo de estudios, aspecto que motivó la ejecución de una investigación dirigida a determinar las frecuencias de grupos sanguíneos ABO y factor Rh en la Comunidad Nativa de Supayaku. Cajamarca (Perú).

MATERIAL Y MÉTODOS

Área estudiada:

La Comunidad Nativa de Supayaku se encuentra ubicada en el distrito de Huarango; provincia de San Ignacio, región Cajamarca, Perú (Fig. 1)

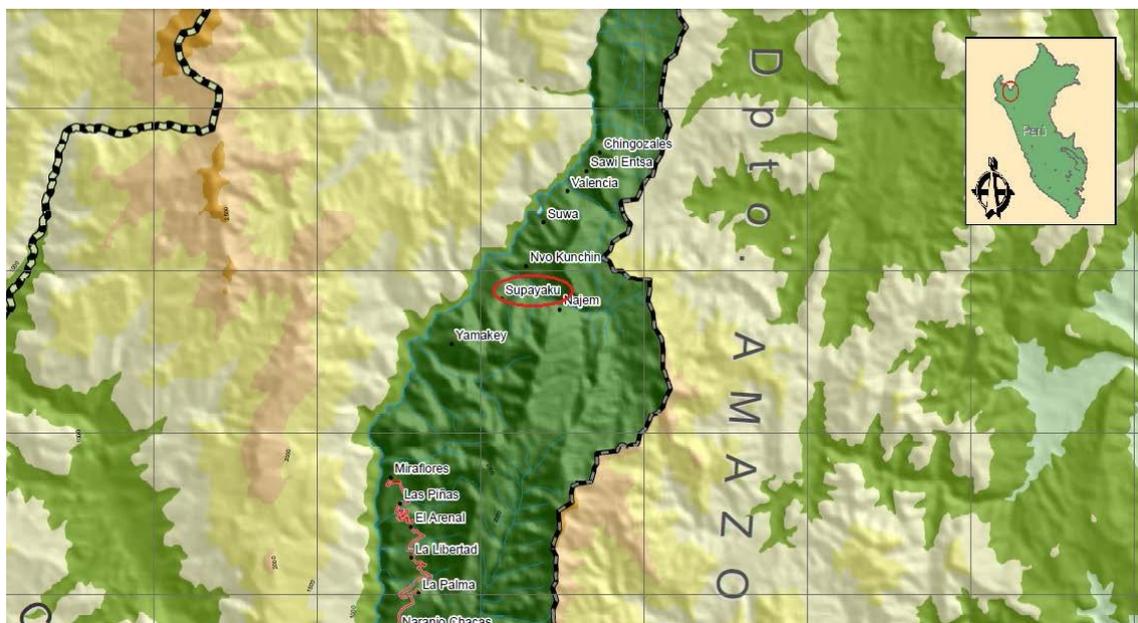


Fig. 1. Ubicación de la Comunidad Nativa de Supayaku.

Población:

La Comunidad Nativa de Supayaku cuenta con 220 nativos todos ellos hablantes de la lengua Aguajú. El estudio se realizó los días 5 y 6 de octubre del 2013; participaron 30 nativos, con edades comprendidas entre los 5 y 80 años (Fig. 2) seleccionados mediante muestreo por conveniencia, bajo el criterio de participación voluntaria. Inicialmente, se invitó a los pobladores que se encontraban reunidos en el salón comunal de la Comunidad Nativa a participar en la campaña de identificación de grupo y factor sanguíneo; al día siguiente el Apu realizó el llamado por los altavoces en idioma aguajú, invitando a los pobladores a que se acerquen al salón comunal para realizarles la toma de muestra para la determinación de su grupo y factor sanguíneo. La muestra quedó determinada por todos los nativos que se acercaron de forma voluntaria al local comunal a participar en la determinación de su grupo y factor sanguíneo que fueron un número de 30.



Fig. 2. Pobladores de la Comunidad Nativa de Supayak (distrito de Huarango, San Ignacio, Cajamarca, Perú) que aceptaron participar en el estudio

Procedimiento e interpretación:

Teniendo en cuenta aspectos básicos de bioseguridad, así como el consentimiento informado si es mayor de edad, y si es menor de edad el permiso correspondiente de sus padres, se efectuó: (i) el registro en planillas específicas elaboradas, (ii) la punción con una lanceta en el área desinfectada (yema del dedo), (iii) la agregación de tres gotas de sangre sobre el portaobjetos separadas por 1 cm de distancia, (iv) el agregado a cada gota de sangre de una gota de anticuerpos monoclonales anti A, anti B y anti D, y (v) la observación si hay aglutinación (reacción antígeno anticuerpo), luego de mezclar la sangre con los antisueros.

Cuando las células sanguíneas se aglutinaban al mezclarse con anticuerpos monoclonales anti A, anti B, corresponden al grupo de sangre A y B respectivamente, cuando se aglutinan ambas corresponden al grupo AB y si las células sanguíneas no se aglutinan con ninguno de los anticuerpos, el grupo sanguíneo es O. Cuando las células sanguíneas se aglutinan al mezclarlas con anticuerpos anti D es Rh positivo, si no aglutinan es negativo. Finalmente, se anotaron los resultados en la planilla correspondiente.

RESULTADOS

Se encontró que todos los pobladores (100%) pertenecían al grupo sanguíneo “O” y eran Rh⁺ (Tablas 1 y 2)

Tabla 1. Distribución de la frecuencia de los Grupos Sanguíneos ABO, en la comunidad Nativa de Supayaku (San Ignacio, Cajamarca, Perú).

Grupos Sanguíneos	Número	Porcentaje
Grupo O	30	100
Grupo A	0	0
Grupo B	0	0
Grupo AB	0	0
Total	30	100

Tabla 2. Distribución de la frecuencia Factor Rh (D), en la Comunidad Nativa de Supayaku (San Ignacio, Cajamarca, Perú).

Factor Sanguíneo	Número	Porcentaje
Factor Rh (D) positivo	30	100
Factor Rh (D) negativo	0	0
Total	30	100

DISCUSIÓN

El estudio de los pobladores de la Comunidad Nativa de Supayaku, muestra que un 100% poseen tanto grupo sanguíneo "O", como Factor Rh positivo, siendo estos resultados iguales a los resultados obtenidos por Beeckman L y Weber 2003^{3,15}, los cuales señalan en su cuadro de frecuencia (%) de fenotipos sanguíneos ABO según continentes, países y etnias que la población indígena para el Perú es 100% grupo sanguíneo "O". Uno de los factores más importantes que influye en la frecuencia de grupos sanguíneos es la raza; la presencia del grupo sanguíneo nos indica el mayor grado de pureza indígena¹⁰.

Según el Ministerio de Salud a través del Programa Nacional de Hemoterapia y Bancos de Sangre (PRONAHEBAS)⁹, sostiene que entre el 3% y el 6% de la población peruana es AB positivo, un 10% al 20% cuenta con sangre tipo A positivo y aproximadamente el O positivo abarca el 80%, además señala que solo el 1% de la población peruana pertenece al Factor Sanguíneo Rh negativo (O, A, B, AB); estos resultados no coinciden con la población nativa de Supayaku, ya que ellos pertenece al grupo sanguíneo O, factor Rh positivo en un 100%.

Los resultados de los grupos sanguíneos ABO (100% grupo O) y factor RH (100% positivo) en la Comunidad Nativa de Supayaku, son diferentes a los reportes en grupos de indígenas de EEUU, según American Association of Blood², que consignan un 79% de sujetos del grupo O, un 16% del grupo A, un 14% del grupo B y la presencia de AB en menos de 1%, además si los comparamos con los Mayas de México pues se acercan mucho a sus frecuencias sanguíneas ya que estos poseen un 94.2% del grupo sanguíneo O y 100% de factor Rh positivo⁸.

Los grupos sanguíneos son considerados marcadores genéticos por la facilidad de clasificación en diferentes fenotipos, su transmisión hereditaria simple y sus frecuencias distintas poblaciones. Estos presentan además de su interés intrínseco y su importancia clínica, una importante aplicación en estudios de familias, de análisis de ligaduras y genética de poblaciones¹³ como en la Comunidad Nativa de Supayaku.

El test de los grupos sanguíneos no se ve afectado por la edad, sexo o medio ambiente, y es bien conocido por su herencia; es evidente que los genes de los grupos sanguíneos no son indiferentes con relación al valor selectivo, como durante mucho tiempo se pensó, es así que Pérez et al.¹¹, sostiene que la gente con diferentes grupos muestra diferencias para padecer ciertas enfermedades, las personas pertenecientes del grupo O, son más susceptibles a padecer de úlcera duodenal o gástrica, artritis reumatoidea y enfermedad Von Willebrand; esto pondría en riesgo de padecer de estos males a la población de la Comunidad Nativa de Supayaku, ya que presentan todos este grupo sanguíneo.

En el sistema Rh, el factor Rh positivo es más frecuente que el negativo, como el determinado en la Comunidad Nativa de Supayaku (100% Rh negativo), en contraste con la población Vasca de España que tiene la mayor incidencia de factor Rh negativo llegando hasta el 30-35%⁵.

Se utilizó el muestreo no probalístico por conveniencia bajo el criterio de participación voluntaria¹ ya que por creencias, desconocimiento de su lengua aguajú, difícil acceso a los nativos, dispersa distribución de la población; solo se pudo realizar el estudio con 30 nativos; la desventaja de utilizar dicho muestreo es que nos permitió seleccionar a los sujetos que estaban disponibles a participar en la investigación; sin embargo una de las desventajas de este muestreo es que nos impide hacer generalizaciones de los resultados a toda la comunidad nativa.

AGRADECIMIENTOS

A mis alumnos Crusvelina Alberca, Yomen Cubas, Jhon Figueroa, Aldo Silva, Liliana Tineo, Edison Peña, de la carrera de Tecnología Médica y al grupo de alumnos investigadores de las carreras de Ingeniería Forestal y Ambiental y de Ingeniería de Industrias Alimentarias; de la Universidad Nacional de Jaén. A María por estar siempre presente. A Sergio Kasen, Apu de la Comunidad Nativa Supayaku, y a Alex Jempekit Unkuch que fue el nexo entre la Universidad Nacional de Jaén y la Comunidad Nativa de Supayaku.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abascal E, Grande I. Análisis de Encuestas. España: Edit. ESIC. 2005.
2. American Association of blood Banks. Technical Manual of the American Association of Blood Banks. 8th ed. Washington D.C. 1981.
3. Beckam L. Racial and ethnic differences in distribution of human ABO blood type groups, (s. <http://www.bloodbook.com/word-abo-html>).
4. Carmona – Fonseca J., 2006. Grupos Sanguíneos ABO y Rh en la población laboral del valle de Aburrá y del cercano oriente de Antioquía (Colombia). Acta Med Colomb 31: 20-30.
5. Cossio E. et. al., 2013. Tipificación del grupo sanguíneo ABO y el factor Rh en la población de Totora-Cochabamba gestión 2012.
6. Guisa-Vásquez J., 1994. Genética Clínica. 1994. 2da edición. México D.F. Editorial El Manual Moderno. 367 – 8.
7. Instituto Nacional de Estadística e Informática INEI. 2009. Población indígena en el Perú. Perú.
8. Linares J. 1986. Inmunología. 2012
9. Ministerio de Salud. 2012. Programa Nacional de Hemoterapia y Bancos de Sangre (PRONAHEBAS). Perú.
10. Ossa H. 1994. Estudios genéticos en las comunidades indígenas del noriente colombiano. Revista de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Vol. 42 N° 1 9-16.
11. Pérez L. 2011. Grupos sanguíneos ABO, RhD y esclerosis múltiple. Rev Cuban Hematol Inmunol Hemoter; 27(2): 244-251. Disponible en: http://scielo.sld.cu/cielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892011000200008&Ing=es.
12. República del Perú. 1978. D.L. N° 22175 La Ley de Comunidades Nativas y de Desarrollo Agrario de Selva y Ceja de Selva. Perú.
13. Thompson T. 2008. Genética en Medicina. 7ma edición. Editorial Elsevier. Barcelona. España.
14. Vásquez H. 2002. Frecuencia de grupos sanguíneos ABO y Rh en estudiantes universitarios. Rev. Med. Vol. 63 N° 2.
15. Weber K. 2003. Blood groups systems. En: Geer J., et al. Wintrobe's Clinical Hematology, 11 th ed., Lippincott Williams; 2003. Volumen 1, capítulo 23: 7933-9.
16. Yamoto F., 2008. Immunogenetics of the Histo-Blood Group ABO system. Burnham Institute for Medical Research. Osaka. Japón.

Correspondencia: José Luis Polo Corro. Email: biologopolo@hotmail.com



Artículo Original

Efecto de las concentraciones del surfactante Polioxietileno (20) Monooleato de sorbitán "Tween 80" en la biodegradación de petróleo Diesel II en suelo por *Pseudomonas aeruginosa*

Effect of the concentrations of surfactant Polyoxyethylene (20) Sorbitan monooleate "Tween 80" on Diesel II oil biodegradation in soil by *Pseudomonas aeruginosa*

Diana Periche Fiestas¹ y Heber Robles Castillo²

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

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

El proceso de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados utilizando surfactantes está condicionado al tipo y concentración de éste. En la presente investigación se determinó el efecto del surfactante Polioxietileno (20) Monooleato de sorbitán "Tween 80" en la biodegradación de petróleo Diesel II, en suelo, utilizando *Pseudomonas aeruginosa*. La muestra de suelo estuvo constituida por arena recolectada del Puerto de Salaverry (Perú) la cual, luego de su tratamiento, se colocó (1.950 Kg) en cada uno de los cuatro biorreactores, de 3 Kg de capacidad. A cada biorreactor se le agregó petróleo Diesel II al 5% y 50 mL de *P. aeruginosa*. Al biorreactor 1, considerado como el control, no se le agregó surfactante y a los demás (2, 3 y 4) sí, al 0.1%, 0.5% y 1.0%, respectivamente. En un periodo de evaluación de 15 días, se determinó: (i) los Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) mediante el método Soxhlet, (ii) el porcentaje de eficiencia en la biodegradación a través del método de Gerber y (iii) el número (recuento microbiano) mediante el método estándar del recuento en placa por superficie. Se encontró: (i) diferencia significativa entre los tratamientos y el control, (ii) que cuando se aplicó "Tween 80" al 0.1% y al 0.5% hubo una eficiencia similar (90.48%, 80.13% respectivamente), (iii) diferencia significativa entre los días de evaluación, con mayor biodegradación en los primeros siete días y (iv) que cuando se aplicó "Tween 80" al 0.1% se dio un mayor crecimiento microbiano a los 9 días (39×10^{10} UFC/g). Se concluye que "Tween 80" tiene efecto positivo en la biodegradación, y que la concentración óptima para éste proceso es al 0.1%.

Palabras clave: Biodegradación, surfactante, Tween 80, Diesel II, *Pseudomonas aeruginosa*, biorreactor

ABSTRACT

The process of hydrocarbon biodegradation in contaminated soils using surfactants is subject to the type and concentration of this. In this research, the effect of surfactant Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate "Tween 80" was determined in the biodegradation of petroleum Diesel II, on floor, using *Pseudomonas aeruginosa*. The soil sample consisted of sand collected from the Port of Salaverry (Peru) which, after treatment, was placed (1,950 kg) in each of the four bioreactors, 3 Kg capacity. Each bioreactor Diesel oil was added 5% II and 50 mL of *P. aeruginosa*. The bioreactor 1 considered the control will not be added surfactant and others (2, 3 and 4) if, at 0.1%, 0.5% and 1.0%, respectively. In a period of 15-day evaluation, it was determined: (i) the Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) by Soxhlet method, (ii) the percentage of biodegradation efficiency through the method of Gerber and (iii) the number (microbial) count using the standard plate count method for surface. It was found: (i) significant difference between treatment and control, (ii) similar efficiency (90.48%, 80.13%, respectively) when "Tween 80" was applied to 0.1% and 0.5%, (iii) more biodegradation in the first seven days, and (iv) when "Tween 80" was applied to 0.1% gave a greater microbial growth at nine days (39×10^{10} CFU/g). In conclusion, "Tween 80" has a positive effect on the biodegradation, and the optimum concentration for this process is 0.1%.

Keywords: Biodegradation, surfactant, Tween 80, Diesel II, *Pseudomonas aeruginosa*, bioreactor

INTRODUCCIÓN

La actividad industrial ha ocasionado uno de los problemas ambientales más importantes en la actualidad en materia de contaminación de ecosistemas acuáticos y terrestres, de modo tal que el vertido de hidrocarburos de petróleo y sus derivados ocupa uno de los primeros lugares debido a su baja velocidad de degradación natural^{1,2,3}. En el Perú, han afectado la biodiversidad típica de los ecosistemas a través de los derrames de petróleo, tal como sucedió en el oleoducto marino de Talara, el río Marañón que afectó la Reserva Pacaya-Samiria, la caleta de Zorritos-Tumbes el rompimiento del oleoducto Nor-Peruano debido a accidentes naturales y por la actividad extractiva⁴.

Se sabe que en el suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos, como evaporación y penetración que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida pueden ser procesos más o menos lentos lo que ocasiona una mayor toxicidad, con la consecuente reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal, cambios en la dinámica poblacional de la fauna y la biota microbiana y contaminación por infiltración de cuerpos de aguas subterráneas^{4,5,6,7,8}.

La biodegradación de hidrocarburos en suelos, dentro de ella la biorremediación microbiana, es una alternativa que puede emplearse tanto para el tratamiento, como para la disposición final de los residuos producidos por las refinerías del petróleo; estos sistemas de descontaminación se basan en la digestión de las sustancias orgánicas por los microorganismos, de la cual obtienen la fuente de carbono necesaria para el crecimiento de sus células y una fuente de energía para llevar a cabo todas las funciones metabólicas que necesitan sus células para su crecimiento y para que estos procesos metabólicos se lleven a cabo, es necesario que existan en las medias condiciones físico-químicas óptimas las cuales se ven influenciadas por la temperatura, pH, humedad, aceptores de electrones y nutrientes^{4,7,8,9,10,11,12,13}.

Las bacterias del género *Pseudomonas* poseen la habilidad para utilizar hidrocarburos como fuente de carbono y energía necesaria para su crecimiento, generando productos más sencillos²⁵. Estas bacterias son productoras de biosurfactantes como ramnolípidos involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados^{14,15}. *P. aeruginosa* es un microorganismo muy utilizado en biorremediación y presenta una serie de actividades naturales sobre xenobióticos y ha sido identificada como degradadora de n-hexadecano, mineralización de compuestos alifáticos en condiciones anaerobias y degradadora de hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos, así como del pireno in vitro^{16,17}.

En los últimos años se han desarrollado técnicas de remediación que incluyen el uso de surfactantes, que son moléculas anfipáticas que poseen la capacidad de interactuar con compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos a la vez y por lo tanto ubicarse en la interfase de los mismos, tanto a escala de laboratorio como a campo^{18,19,20}. Entre las propiedades de los surfactantes están: (i) emulsión, es un sistema termodinámicamente inestable y tiende a separarse en dos fases, estas emulsiones pueden reducir la tensión superficial, aumentar el metabolismo microbiano con el hidrocarburo y puede incrementar la actividad enzimática microbiana. A mayor emulsificación mejor solubilización de aceite en las micelas de surfactante, (ii) balance lipofílico-hidrofílico (HLB), es una expresión de la afinidad de la molécula del surfactante a la materia orgánica y a la fase acuosa. Cuanto mayor sea el HLB, mayor es la tensión superficial y la solubilidad, (iii) tensión superficial (TS) e interfacial (TI), la propiedad más importante del surfactante es su habilidad para adsorberse en interfaces. La TI entre dos líquidos depende de la fuerza de cohesión entre las moléculas de cada líquido y de la fuerza de adhesión entre las moléculas de un líquido y el otro, de esta manera, la tensión interfacial entre dos líquidos está relacionada con la tensión superficial de cada líquido saturado en el otro. Para disminuir la TI, los surfactantes actúan como un “puente” formando una tercera fase de “microemulsión” que favorece la interacción entre la fase acuosa y la del hidrocarburo. En el caso de TS, los surfactantes disminuyen debido a que interfieren en la formación de puente de hidrógeno y otras fuerzas involucradas en la adhesión entre moléculas, (iv) concentración micelar crítica, es la unión de micelas en un aumento de la conductividad eléctrica bajo diversos niveles de su concentración, su valor depende de la naturaleza del surfactante. Los mejores surfactantes son los que tienen valores menores de CMC. La formación de micelas mixtas entre surfactantes y otros compuestos como los hidrocarburos favorecen la dispersión del mismo en medio acuoso aumentando la biodisponibilidad, (v) movilidad, la remoción del petróleo es causado por la reducción de la tensión interfacial, (vi) solubilidad, es causada por las micelas, la solubilidad de los hidrocarburos es proporcional con las concentraciones de surfactantes, por encima de la CMC mejora y

(vii) punto nube, es la temperatura a la cual el surfactante disminuye hasta llegar a un valor crítico en el cual se genera enturbiamiento visible en solución acuosa^{18,19,20,21,22,23,24}.

Existen una gran cantidad de surfactantes disponibles en el mercado, pero muchos no son adecuados, incluso algunos de ellos podrían convertirse en contaminantes¹⁹. La aplicación de surfactantes es algo controvertido incluso en los casos que se logra con éxito la degradación, se ha dado lugar a debates sobre los riesgos de salud ambiental debido a la presencia de estos productos y la posibilidad de su biodegradación^{21,22}. La elección del surfactante o mezcla de surfactantes a ser utilizados en remediación de suelos depende de varios factores como el costo, la biodegradabilidad, la toxicidad, la absorción del surfactante a las moléculas del suelo, la concentración efectiva (<3%), la dispersión del suelo y la disminución en la tensión superficial que éste produzca^{22,24}. Muchos de los investigadores recomiendan el uso de surfactantes no iónicos ya que suelen tener menor toxicidad y mayor biodegradabilidad^{19,21,22,23}.

Uno de los surfactantes no iónicos es el Monooleato de sorbitán etoxilado conocido comercialmente como "Tween 80" es insoluble en agua, pero soluble en la mayoría de disolventes orgánicos y no se ionizan en solución acuosa²³. Tiene baja toxicidad y en general, baja fitotoxicidad. Forma emulsiones estables, considerado un agente espumante leve, no es afectado por la dureza del agua, adecuado para la biorremediación debido a su baja CMC^{24,25,26,27,28}. De acuerdo a Kang et al²⁵, este surfactante puede ser absorbido por el suelo y degradado por los microorganismos hasta en un 99.6%.

Por todo lo expuesto, la finalidad del presente estudio está orientado en evaluar el efecto de tres concentraciones del surfactante "Tween 80" en la biodegradación de petróleo Diesel II en suelo, utilizando *Pseudomonas aeruginosa*. Esto debido a la necesidad de buscar alternativas de solución frente a los grandes problemas de contaminación por derrames de petróleo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

- Cultivo puro de *Pseudomonas aeruginosa* proporcionado por la cátedra de Biotecnología del Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo.

Material no biológico

- Suelo proveniente del puerto de Salaverry. La Libertad-Perú.
- Petróleo Diesel II.
- Surfactante Polioxietileno (20) Monooleato de sorbitán "Tween 80"-Merck.

Los biorreactores²⁸.

Se construyeron cuatro biorreactores de plástico, de forma rectangular para albergar 2 Kg. de la muestra de suelo, de medidas 10 x 15 x 20 cm. con tapa calada para entrada de aire y luz. Uno para el biorreactor control y tres para biorreactores problema.

Recolección y tratamiento de suelo²⁶.

La muestra de suelo fue recolectada cerca de la orilla del mar en el Puerto de Salaverry, La Libertad-Perú; se realizó 15 muestreos de diferentes puntos al azar, y en cada punto a una profundidad de 10 cm, se recolectó 2 Kg de suelo, y se colocó en un saco limpio previamente rotulado, haciendo un total de 30 Kg. aproximadamente, luego fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo (Perú) para su tratamiento inmediato. El suelo fue cernido en una malla N°10 (apertura de 2 mm) para eliminar partículas grandes e impurezas, y se homogenizó para obtener partículas de igual tamaño. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiental (20°C ± 2), con la finalidad de reducir humedad. Luego se esterilizó en bolsas a 121°C por 20 min, con la finalidad de eliminar la población microbiana nativa.

Reactivación, propagación y estandarización de *Pseudomonas aeruginosa*²⁹.

De un cultivo puro se reactivó en agar *Pseudomonas*, y se incubó a 37°C por 24 horas, pasado este tiempo se observó sus características culturales macroscópicas, posteriormente se realizó frotis a partir de éstas y se le hizo coloración Gram para observar sus características microscópicas como: bacilos Gram negativos, rectos o ligeramente curvados- Luego, que se confirmó su viabilidad se procedió a la propagación en agar nutritivo, con la finalidad de incrementar la biomasa microbiana. Después se realizó la estandarización, en un volumen de 200 mL de agua destilada estéril equivalente al tubo N° 2 del Nefelómetro de MacFarland (6 x 10⁸ UFC/mL). Posteriormente, se realizó el método de recuento en placa por superficie para obtener un conteo real

Contaminación del suelo con petróleo Diesel II.

Una vez armados y debidamente esterilizados los cuatro biorreactores, en cada uno se colocó 1.950 Kg de suelo estéril y se agregó petróleo Diesel II al 5% (100 mL), luego se mezcló hasta homogenizar.

Preparación de los sistemas de evaluación.

Los biorreactores conteniendo el suelo contaminado, se acondicionaron de la siguiente manera:

- Biorreactor 1: No se le hizo tratamiento con el surfactante ya que es considerado como el biorreactor control.
- Biorreactor 2: Se adicionó 2 mL. de surfactante (0.1%) disuelto en agua.
- Biorreactor 3: Se adicionó 10 mL. de surfactante (0.5%) disuelto en agua.
- Biorreactor 4: Se adicionó 20 mL. de surfactante (1.0%) disuelto en agua.

Luego en los biorreactores 2, 3 y 4; se mezcló el suelo con la solución. Después a los cuatro biorreactores se les inoculó con 50 mL de *P. aeruginosa* (72×10^7 UFC/mL). Luego se taparon los biorreactores y se les dejó a temperatura ambiental ($19^\circ\text{C} \pm 2$)

Evaluación del efecto del surfactante, sobre la biodegradación del petróleo Diesel II.

Para ello se realizó la determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP), determinación de porcentaje de eficiencia en la biodegradación de materia orgánica (Diesel II); así como determinación del crecimiento microbiano de *P. aeruginosa*.

- **Determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP):** Se realizó cuatro muestreos, el primer día de agregado el inóculo, luego se hizo cada 7 días hasta completar 14 días; se tomó una muestra de 100 g. de cada uno de los biorreactores. Se aplicó el Método Soxhlet⁴.
- **Determinación de porcentaje de eficiencia en la biodegradación:** La eficiencia se evaluó empleando el Método de Gerber, indicándose al inicio y al final en un periodo de 14 días de tratamiento⁴⁰.

$$\begin{aligned} \% \text{ eficiencia} &= \text{MOc} / \text{MOi} \times 100 \\ \text{MOc} &= \text{MOi} - \text{MOf} \end{aligned}$$

Donde: MOc = Materia orgánica consumida (% de petróleo v/v), MOi = Materia orgánica inicial (% de petróleo v/v), MOf = Materia orgánica final (% de petróleo v/v)

- **Determinación del recuento microbiano de *Pseudomonas aeruginosa*:** Se realizó cuatro muestreos, el primer día de agregado el inóculo, luego cada 3 días hasta completar 15 días. Se realizó diversas diluciones y se aplicó el Método de recuento en placa por superficie, utilizando Agar nutritivo, luego se incubó a 37°C por 24 horas. Los datos fueron ingresados al software Microsoft office Excel Profesional 2008 para elaborar la curva de crecimiento³⁰.

Evaluación estadística.

A los resultados de la determinación de HTP, consumo de materia orgánica y recuento de microorganismos a las diferentes concentraciones del surfactante, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para la comparación de promedios y obtención de la diferencia significativa.

RESULTADOS

El promedio del porcentaje de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) se mostró diferente (con significancia estadística, $p < 0.05$) entre los tratamientos y el control; asimismo, hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los días de evaluación, en donde los primeros 7 días hay una mayor biodegradación del petróleo (Fig. 1).

En relación al porcentaje de eficiencia en la biodegradación (Fig. 2) también se encontró diferencia significativa ($p = 0.0017$), entre los tratamientos y el control: cuando se aplicó "Tween 80" al 0.1%

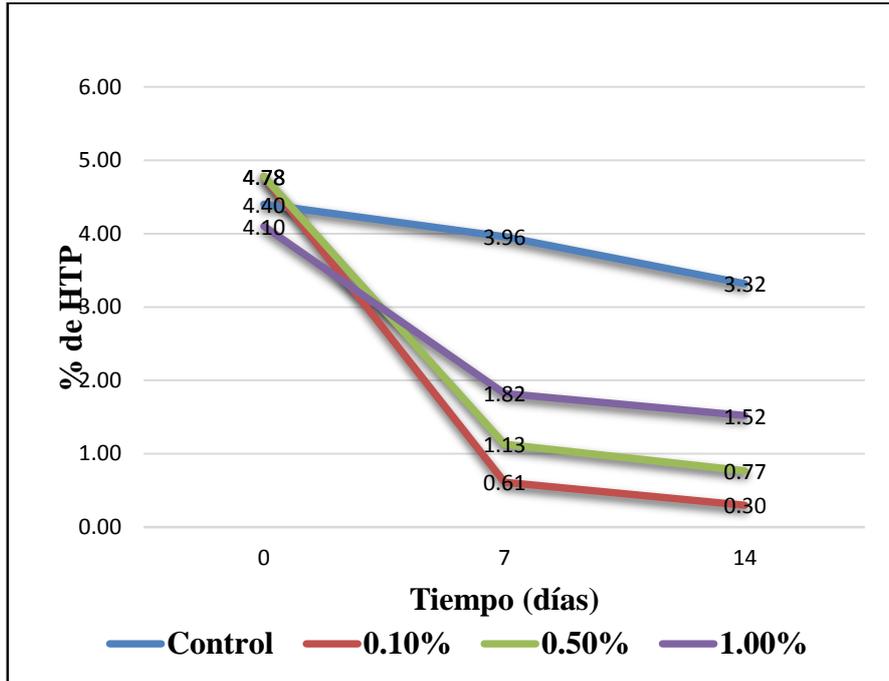


Fig. 1. Promedio de porcentajes de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) durante el proceso de biodegradación de petróleo Diesel II en suelo, por *Pseudomonas aeruginosa*, empleando diferentes concentraciones de "Tween 80" durante 14 días a temperatura ambiental ($19^{\circ}\text{C} \pm 2$). $p = 0.0098$. Si existe diferencia significativa.

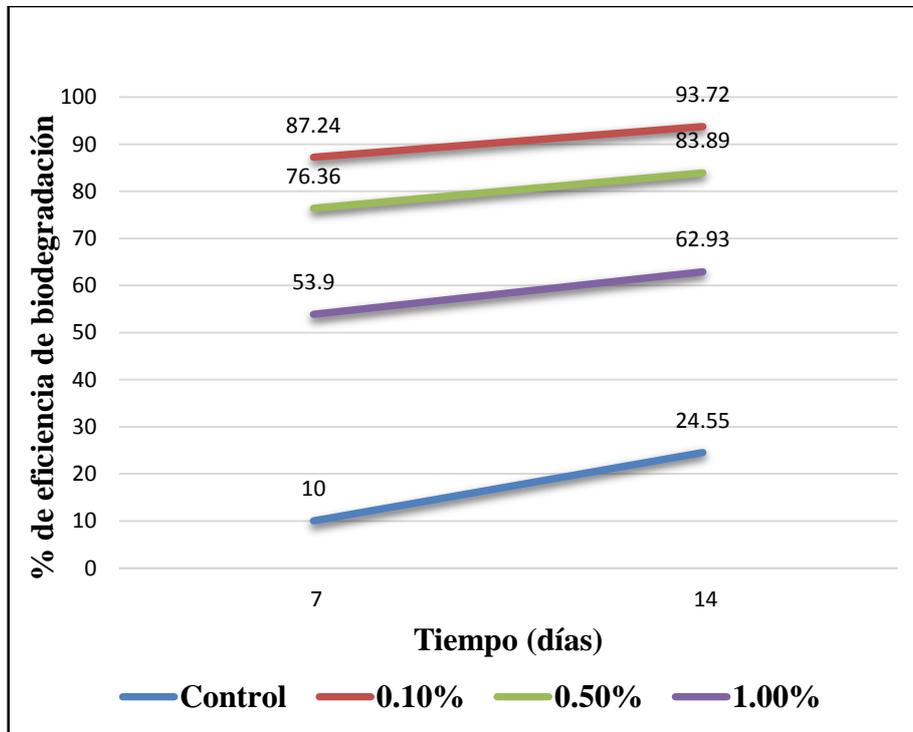


Fig. 2. Porcentajes de eficiencia en la biodegradación de petróleo Diesel II en suelo, por *Pseudomonas aeruginosa*, empleando diferentes concentraciones de "Tween 80" durante 14 días a temperatura ambiental ($19^{\circ}\text{C} \pm 2$). $p = 0.0017$. Si existe diferencia significativa.

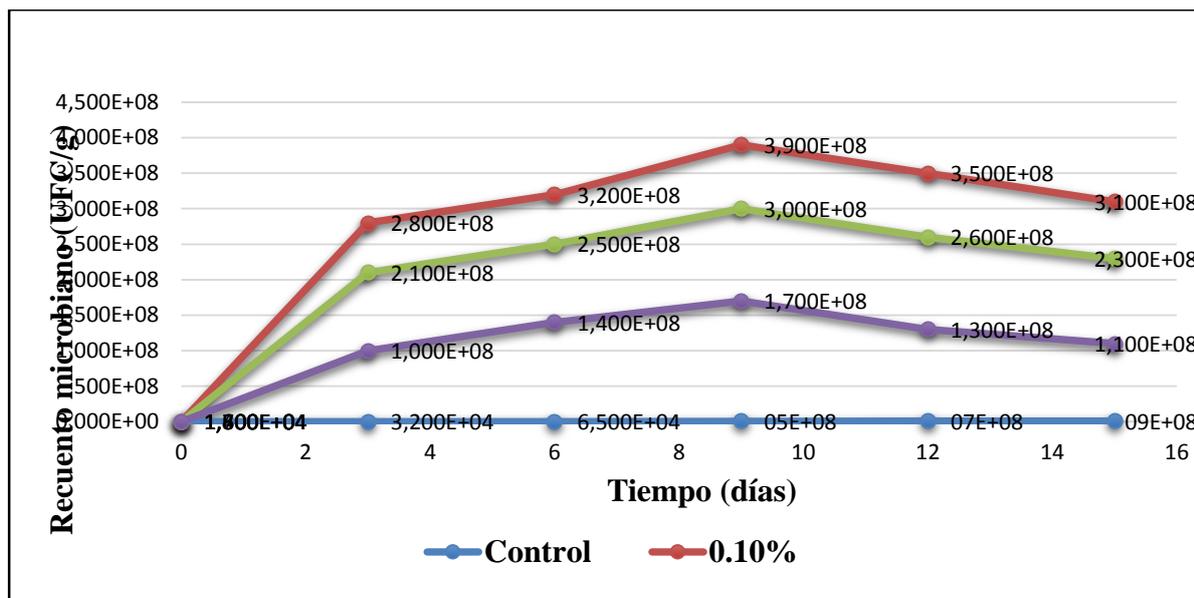


Fig. 3. Promedio de recuentos microbianos de *Pseudomonas aeruginosa* durante el proceso de biodegradación de petróleo Diesel II en suelo, empleando diferentes concentraciones de “Tween 80” durante 15 días a temperatura ambiental ($19^{\circ}\text{C} \pm 2$).

hubo una mayor eficiencia (90.48) pero, cuando se aplicó “Tween 80” al 0.5% su eficiencia fue similar (80.13); a diferencia de cuando se aplicó “Tween 80” al 1.0% (58.42).

Respecto del promedio del recuento bacteriano de *P. aeruginosa*, se observó que hasta el día 9 hay crecimiento microbiano; asimismo, que la mayor densidad microbiana fue cuando se aplicó “Tween 80” al 0.1% con un crecimiento de 39×10^{10} UFC/g de suelo, en cambio la menor densidad microbiana fue cuando se aplicó “Tween 80” al 1.0% con un crecimiento de 17×10^{10} UFC/g de suelo (Fig. 3).

DISCUSIÓN

Cuando se hace referencia a la biorremediación, además de considerar las vías degradativas de los microorganismos que llevan a cabo la detoxificación de los contaminantes, es necesario considerar otros factores que influyen en el rendimiento de la biorremediación; es decir, no es suficiente adicionar microorganismos con alta eficiencia degradativa, si existen factores que limiten su verdadero potencial, uno de estos factores es la biodisponibilidad del contaminante^{21,31}.

Esta biodisponibilidad se puede lograr con el uso de surfactantes; múltiples estudios^{32,33,34} han indicado que los surfactantes no iónicos (Tween 80) son los más efectivos para la eliminación de contaminantes orgánicos en los suelos por su capacidad de solubilización y biodegradación, suelen tener menor toxicidad y no son afectados por la dureza del agua. Para poder tener biodisponibilidad de petróleo Diesel II y por ende posterior biodegradación, se utilizó tres concentraciones de “Tween 80”.

La capacidad de biodegradación de un compuesto (Diesel II) por un microorganismo en este caso *P. aeruginosa* puede determinarse midiendo directamente la concentración residual del hidrocarburo³⁵; es así que para ello se utilizó el método Soxhlet, que permite medir el porcentaje de Hidrocarburos Totales de Petróleo; el hecho de hallar que existe diferencia significativa entre los tratamientos y el control, indica que el uso de “Tween 80” tiene un efecto positivo en la biodegradación; esto debido a que tiene propiedades que permiten que *P. aeruginosa* tenga mayor biodisponibilidad del Diesel II. Propiedades como una baja concentración micelar crítica (CMC), que es la concentración mínima de un agente surfactante capaz de formar micelas, lo que le permite la movilización del hidrocarburo^{23,31,34}, entonces, los mejores surfactantes son los que tienen valores menores de CMC en menor volumen y concentración (la concentración del surfactante fue de 0.5%). Es decir, por esta propiedad, cuando se aplicó “Tween 80” al 0.1%, los resultados que se obtuvieron fue un menor porcentaje de HTP.

Así mismo, se ha reportado que los surfactantes con un mayor HBL (Balance Lipofílico-Hidrofílico) dan lugar a una mayor solubilidad y son adecuados para la solubilización de hidrocarburos en suelo.

Otra propiedad es la baja tensión superficial, es así que Riojas et al.²² analizaron la TS (Tensión superficial) de las concentraciones de “Tween 80” y llegaron a la conclusión que a menor dosis mayor TS. Esto es contradictorio al resultado obtenido en este trabajo ya que se dio mayor biodegradación en la concentración menor (0.1%) del surfactante, teniendo éste una mayor TS.

En el control también hubo disminución del porcentaje de HTP, esto puede ser debido a que *P. aeruginosa* es una bacteria productora de biosurfactantes como los ramnolípidos, involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados, como los hidrocarburos. La producción de biosurfactantes facilita que los hidrocarburos entren en contacto directo con la membrana para que sean interiorizados y puedan actuar las oxigenasas, acelerando por tanto el proceso de biorremediación^{28,29,35}. Muchos microorganismos implicados en estos procesos poseen sistemas enzimáticos para degradar y utilizar el petróleo diesel como una fuente de carbono y energía³¹. Estas enzimas pueden ser peroxidasas y oxigenasas, que permiten la oxidación más o menos específica de algunas fracciones del petróleo. Esta oxidación cambia las propiedades de los compuestos, haciéndolos susceptibles de ataques secundarios y facilitando su conversión a bióxido de carbono y agua, basta una oxidación para disminuir su toxicidad³².

El hecho que en los primeros siete días se dio el mayor porcentaje de eficiencia en la biodegradación; podría deberse a que en un inicio ocurre la degradación de las fracciones menos complejas, y más fáciles de degradar, y posteriormente ocurre la degradación de las fracciones más recalcitrantes¹¹. Esto también puede deberse a que como “Tween 80” es un surfactante biodegradable, y a este periodo de tiempo ya las bacterias lo están degradando y por eso baja el porcentaje de eficiencia en la biodegradación. Torres et al.³² informan que “Tween 80” es un surfactante altamente biodegradable y que alrededor del 45% de éste se degrada en un periodo de 168 hrs. Wong et al.³¹ señalan que *P. aeruginosa* cuando se combina con “Tween 80” mejora de manera efectiva la solubilidad y degradación del hidrocarburo. Así mismo, algunos autores reportan que el proceso de degradación del petróleo se puede llevar a cabo desde días hasta meses.

Cuando se aplicó “Tween 80” al 0.1% y al 0.5% existe un promedio de eficacia de biodegradación similar, siendo mejores que cuando se utilizó el “Tween 80” al 1.0%. Pero el mayor porcentaje de eficiencia de biodegradación fue cuando se utilizó la dosis menor (0.1%), esto nos indica que sería la dosis más eficiente; similar resultado reporta Torres y col⁵⁵ que señalan que el mejor resultado para la biorremediación es cuando se aplica una dosis menor de surfactante (las dosis fueron de 0.1, 0.5 y 1%). También se ha reportado que con una dosis de 0.2% de surfactante es suficiente para la biodegradación del suelo contaminado con hidrocarburos y se ha indicado que la mejor eficiencia de biodegradación no siempre está relacionada con el empleo de una alta concentración de surfactante, ya que una alta concentración puede inhibir la biodegradación. En el mismo sentido, se ha señalado que a una alta concentración de surfactante, el sustrato no está disponible porque se encuentra en la fase micelar, las moléculas del sustrato tienen que ser transferidas de la fase micelar a la fase acuosa para que sean biodisponibles para los microorganismos^{23,29,33}.

El proceso de biodegradación, también puede medirse de manera indirecta, ya que se presentan una serie de fenómenos que sirven como indicadores de que la materia orgánica contaminante está siendo degradada, por ejemplo el crecimiento de *P. aeruginosa* empleando como única fuente de alimentación a Diesel II³⁵.

P. aeruginosa alcanzó densidades poblacionales máximas que van desde 17×10^{10} UFC/g hasta 39×10^{10} UFC/g. Una de las posibles causas del incremento de la biomasa microbiana luego de un tiempo de exposición al contaminante es que éstas son capaces de degradar los hidrocarburos a formas menos tóxicas al emplearlas como fuente de carbono, para la síntesis de nuevas células. También se ha demostrado que las bacterias oxidantes del petróleo aumentan de 10^3 a 10^6 veces poco tiempo después de un derrame, similar al resultado obtenido en los primeros tres días, que hubo un incremento de la biomasa, de 10^6 a 10^{10} *P. aeruginosa*. Asimismo, se observó que hubo crecimiento hasta el día nueve, luego empieza a bajar la biomasa microbiana; esto puede deberse al agotamiento progresivo de la fuente de carbono (diesel). En conclusión: (i) las concentraciones 0.1%, 0.5% y 1.0% de “Tween 80” tienen un efecto positivo en el proceso de biodegradación de petróleo Diesel II en suelo, por *P. aeruginosa* y (ii) así la concentración óptima de “Tween 80” es al 0.1% y se puede recomendar que en futuras investigaciones: (i) se deben evaluar y determinar la mejor mezcla de surfactantes que contribuyan a una mayor capacidad de biodegradación y (ii) se debe comparar el efecto de biosurfactante y el efecto de surfactantes químicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez A, Pérez ME, Pinto J, Gurrola BA, Osorio AL. Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Rev Int Contam Ambient.* 2011; 27(3): 241-252.
2. Kaczorek E, Cieslak K, Bielicka K, Olszanowski A. The Influence of Rhamnolipids on Aliphatic Fractions of Diesel Oil Biodegradation by Microorganism Combinations. *Indian J Microbiol.* 2013; 53(1): 84-91.
3. Sarkar D, Ferguson M, Datta R, Birnbaum S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbón supplementation, and monitored natural attenuation. *Environ Pollut.* 2005; 136:187-195.
4. Vallejo V, Salgado L, Roldan F. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Rev Colomb Biotecnol.* 2005; 7(2): 67-78.
5. Acuña A, Pucci G, Morales MJ, Pucci O. Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2010; 30:29-36.
6. Monticello DJ. Biotransformation and the upgrading of petroleum distillates. *Curr Op Biotechnol.* 2000; 11(6): 539-546.
7. Riojas HH, Gortáres P, Mondaca I, Balderas JJ, Torres LG. Evaluación de la biorremediación aplicando mezclas de surfactante-solvente en suelo contaminado con diesel. *Rev Latinoam de Recursos Naturales.* 2010; 6(2): 100-109.
8. Salimen J, Tuomi P, Suortti A, Jorgensen K. Potential for aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface. *Biodegradation.* 2004; 15: 29-39.
9. Vera G, Tam J, Pinto E. Efectos ecotoxicológicos del petróleo crudo, diesel 2 y kerosene sobre el crecimiento poblacional de la microalga *Chaetoceros gracilis* Schutt. *Ecol apl.* 2009; 8(1): 1-7.
10. Benavides J, Quintero G, Guevara AL, Jaimes DC, Gutiérrez SM, Miranda J. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova.* 2006; 4(5):82-90.
11. Martín C, González A, Blanco MJ. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev Iberoam Micol.* 2004; 21:103-120.
12. Ferrera R, Rojas NG, Poggi HM, Alarcón A, Cañizares RO. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev Latinoam Microbiol.* 2006; 48(2): 179-187.
13. Pérez RM, Camacho MI, Gómez JM, Ábalos A, Viñas M, Cantero D. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Rev Cenic Cienc Biol.* 2008; 39(1): 44-51.
14. Gómez SE, Gutiérrez DC, Hernández AM, Hernández CZ, Losada M, Mantilla PC. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova* 2008; 6(9): 101-212.
15. Rockne KJ, Chee JC, Sanford RA, Hedlund BP, Staly JT, Strand SE. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(4): 1595-1601.
16. Chen F, Xia Q, Kwang L. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H Fluorescence. *Appl Environ Microbiol.* November 2003; 69(11):6715-6722.
17. Demanéche S, Kay E, Gourbière F, Simonet P. Natural transformation of *Pseudomonas fluorescens* and *Agrobacterium tumefaciens* in soil. *Appl Environ Microbiol.* June 2001; 67(6):2617-2621.
18. Araujo I, Gómez A, Barrera M, Angulo N, Morillo G, Cárdenas C, et al. Surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas contaminadas con crudo liviano. *Interciencia.* 2008; 33(4):245-250.
19. Pérez J, Anaya O, Chang CK, Membrillo Isabel, Calva G. Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno crecidas en hidrocarburos. *Rev Cenic. Ciencias Químicas.* 2010; 41:1-9.
20. Jiménez D, Medina SA, Gracida JN. Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Rev Int Contam Ambient.* 2010; 26(1):65-84.
21. Riojas HH, Moroyoqui PG, Mondaca I, Balderas J. Influencia de los surfactantes en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Rev Facultad de Ciencias Básicas.* 2011; 7(1):94-115.
22. Riojas HH, Torres LG, Mondaca I, Balderas J, Gortáres P. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Rev Química Viva.* Diciembre 2010; 3(9):120-145.
23. Riojas HH, Gortáres P, Mondaca I, Balderas J. Aplicación de Tween 80 y D-Limoneno en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos. *Ideas Concuteg.* 2011; 6(71):571-584.
24. Paria S, Yuet PK. Adsorption of nonionic surfactants onto sand and its importance in naphthalene removal. *Ind Eng Chem* 2007; 46:108-113.
25. Kang SW, Kim YB, Shin JD, Kim EK. Enhanced Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Biosurfactant, Sphorolipid. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 160: 780-790.

26. Beal R, Bettz W. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* 2000; 89:158-168.
27. Cybulski Z, Dziurla E, Kaczorek E, Olszanowski A. The influence of emulsifiers on hydrocarbon Biodegradation by Pseudomonadacea and Bacillacea strains. *Spill Science and technology bulletin*. 2003; 8:505-507.
28. Calvo C, Toledo F, Gonzales J. Surfactant activity of naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *J Biotechnol* 2004; 109: 255-262.
29. Ezeji E, Anyanwu B, Onyeze G, Ibekwe V. Studies on the utilization of Petroleum Hydrocarbon by Micro Organism isolated from oil Contaminated Soil. *Int J Nat Appl Sci* 2005; 1(2): 122-128.
30. Torres LG, Orantes JL, Iturbe R. Biodegradation of Two Nonionic Surfactants Used for In Situ Flushing of Oil- Contaminated Soils. *Tenside Surfactant Detergents* 2006; 43(5):251-255.
31. Wong JW, Fang M, Zhao Z, Xing B. Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions. *Journal of Environmental Quality*. 2004; 33:2015-2025.
32. Torres LG, Lemus X, Urquiza G, Verdejo A, Iturbe R. Surfactant enhanced washing of drilling fluids, a promising remediation technique. *Tenside Surfactant Detergents*. 2005; 42(6):347-355.
33. Youssef NH, Nguyen T, Sabatini DA, Mcinerney MJ. Basis for formulating biosurfactant mixtures to achieve ultra low interfacial tension values against hydrocarbons. *J Indust Microbiol Biotechnol* 2007; 34: 497-507.
34. Guha S, Jaffé PR. Bioavailability of hydrophobic compounds partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environm Scien & Technol*. 1996; 2:575-580.
35. Nwaogu L, Onyeze G, Nwabueze R. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *African J Biotchnol* 2008; 7(12):1939-1943.

Correspondencia: Heber Robles Castillo. Email: hrobles@unitru.edu.pe



Artículo Original

Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos

Isolation and selection of cellulolytic bacteria from compost organic waste

Luis A. Rodríguez Silva¹ y Luis Llenque Díaz²

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

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

Se aisló y seleccionó bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos de la Estación Experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo (Perú). Para ello: se pesó 10 g de muestra y se colocó en 90 mL de agua peptonada 0.1%, se hicieron diluciones seriadas y siembras en agar CMC 1% que fueron incubadas a 35°C por 48 h, se resembró en agar CMC 1% y se seleccionaron colonias que presentaban los mayores halos de hidrólisis mediante la prueba con Rojo de Congo y, finalmente, se hicieron siembras por puntura en agar CMC 1% de los cultivos seleccionados: Col 1, C4 y C5, en tres repeticiones y se obtuvo el promedio de los halos netos de hidrólisis. Posteriormente, se realizó la bioquímica de los cultivos celulolíticos seleccionados y se determinó la fase logarítmica media de crecimiento bacteriano en 10 mL de caldo CMC 0.7% pH 6.5, a 37°C, con un mL de inóculo de 3×10^8 UFC/mL. Se encontró, en relación a los promedios de los halos netos de hidrólisis, que no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los halos de las bacterias C4 y C5, pero sí entre el cultivo Col 1 y los demás. Los cultivos correspondieron a *Paenibacillus* sp. (Col 1), *Bacillus firmus* (C4) y *Bacillus* sp. (C5) que alcanzaron su fase logarítmica media de crecimiento a las 6 h en las condiciones ensayadas.

Palabras clave: Compost, bacterias celulolíticas, *Paenibacillus*, *Bacillus*

ABSTRACT

It was isolated and selected cellulolytic bacteria from compost organic waste from the Experimental Station of Applied Biochemistry, National University of Trujillo (Peru). 10 g of sample were added to 90 mL of peptone-water 0.1% medium, serial dilution and crops were made in agar CMC 1%, then were incubated at 35 °C for 48 h, replanted in agar CMC 1%, and selected the colonies with highest halos hydrolysis. Testing were made with Red Congo technique by means puncture in agar CMC 1% medium of selected crops: Col 1 C4 and C5, three repetitions and the average was obtained net hydrolysis halos. Subsequently, the biochemistry of the selected cellulolytic cultures were performed and the average logarithmic phase of bacterial growth was determined in 10 mL of 0.7% CMC broth pH 6.5, at 37 °C with an inoculum of 3×10^8 mL CFU / mL. He found, in relation to the average net hydrolysis halos, no significant difference ($p > 0.05$) between the halos of the C4 and C5 bacteria, but between cultivation Col 1 and others. Cultures were for *Paenibacillus* sp. (Col 1), *Bacillus firmus* (C4) and *Bacillus* sp. (C5) which reached their mid-log phase growth at 6 h under the conditions tested.

Keywords: Comppost, cellulotyc bacteria, *Paenibacillus*, *Bacillus*.

INTRODUCCIÓN

En el proceso de compostaje los microorganismos participan por medio de secreciones de enzimas hidrolíticas que tienen un papel fundamental en la depolimerización de los componentes orgánicos de los diferentes residuos. Las más importantes son las celulasas, hemicelulasas, proteasas, lipasas fosfatasas y arilsulfatasas que hidrolizan moléculas grandes como almidón, celulosa, hemicelulosa, pectina, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que son asimilados por los microorganismos como fuente de carbono y energía^{1,2,3}. Moléculas como hemicelulosa y celulosa están presentes en gran cantidad en el compost proveniente de residuos agrícolas; los microorganismos celulíticos y en particular las bacterias aeróbicas convierten la celulosa en dos productos principales: CO₂ y biomasa; no existen acumulaciones significativas de intermediarios carbonados y la concentración de ácidos orgánicos raramente alcanza un nivel apreciable^{3,4,5,6,7}.

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos⁷. Las bacterias celulolíticas más abundantes y conocidas son las aerobias, entre ellas: *Cellulomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Cytophaga*. *Acetivibrio cellulolyticus*, *Clostridium cellulovorans*, *Ruminococcus albus*, *Butirivibrio* sp. *Clostridium thermocellum* destacan entre las anerobias y *Streptomyces drozdowiczii*, *S. cellulolyticus*, *Themomonospora curvata*, *T. chromogena*, *T. alba* y *Thermomobifida fusca*, entre los estreptomycetos^{8,9,10,11,12}.

Bacillus es reconocido industrialmente atractivo por sus altas tasas de crecimiento, gran capacidad para la secreción de enzimas extracelulares, así como su desarrollo bajo condiciones ambientales extremas⁸. Se sabe que naturalmente metaboliza una amplia variedad de azúcares incluyendo xilosa, arabinosa, celulosa, sacarosa, celobiosa y glucosa; sin embargo, a pesar del extenso conocimiento genético y bioquímico del género²⁵, existe poca información de aspectos bioenergéticos, metabólicos, de crecimiento y de formación de productos en condiciones aeróbicas para la utilización de carboximetildelulosa^{10,12}

Diferentes procedimientos han sido utilizados en la identificación y enumeración de los microorganismos capaces de utilizar la celulosa, siendo la base de éstos la hidrólisis de los sustratos celulósicos. Destaca dentro de ellos el Rojo de Congo porque permite evidenciar la hidrólisis de polisacáridos, debido a que el colorante forma complejos con las moléculas no hidrolizadas, facilitando así la diferenciación entre microorganismos celulolíticos y no celulolíticos mediante zonas de aclaramiento alrededor de la colonia^{13,14,15,16,17}.

La actividad del sistema enzimático en el complejo celulolíticos puede medirse determinando la cantidad de glucosa liberada mediante DNS; esta técnica demuestra la presencia del grupo carbonilo libre (C=O) de los azúcares reductores que implica la oxidación del grupo funcional aldehído de la glucosa^{18,19}. En este método el ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que los grupos aldehídos son oxidados a grupos carboxilos; la reducción del ácido genera un color amarillo el cual es proporcional a la concentración del azúcar reductor presente y se evidencia por medio de la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro lo que implica la aplicación de la ley de Lambert Beer²⁰.

Los azúcares liberados del proceso pueden ser usados en varios propósitos, como el incremento de azúcares asimilables en los forrajes y la producción de etanol^{21,22}. Además por ser un producto que posee diferentes características, entre ellas ser edulcorante, preservante humedad, inhibidor frente a levaduras y mohos, estabilizador de la viscosidad; tiene gran aplicación en la industria farmacéutica y alimentaria²³. Al mismo tiempo, el material lignocelulósico es atractivo por su bajo costo y alta disponibilidad en diversos climas y localidades, sin embargo, el principal impedimento para su utilización es la falta de una tecnología de bajo costo para degradar la fracción recalcitrante de la biomasa²⁴.

El compostaje es un proceso biológico aerobio en la que se transforman los residuos orgánicos degradables en un producto estable e higienizado, que es aplicable como mejorador de suelos y sustratos y es método eficiente en la eliminación de residuos orgánicos. En el presente trabajo se propuso el aislamiento y selección de microorganismos celulolíticos a partir de compost del centro de investigaciones bioquímicas de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú, a fin de ofrecer a la comunidad industrial y empresarial especies nativas de microorganismos celulolíticos, cuyas enzimas puedan ser utilizados como alternativa a las enzimas comerciales que tienen alto costo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

Compost de residuos orgánicos procedente de la Estación Experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT), Perú.

Obtención y transporte de la muestra

Se obtuvieron 09 muestras de compost, en una cantidad de 200 g cada una y depositadas en recipientes plásticos, debidamente rotulados y posteriormente llevados al Laboratorio de Fisiología y Genética Bacteriana de la UNT.

Descripción de la composición de los residuos para la formación del compost

El compost obtenido presentó un alto contenido de residuos orgánicos vegetales tales como tallos y hojas de plantas herbáceas (Papaya, Fresa, Maracuyá, Alfalfa, Uva, etc.) y estiércol de ganado vacuno.

Aislamiento y selección primaria^{16,17}

Se pesó 10 g de la muestra homogeneizada y se colocó en 90 mL de agua peptonada 0.1%(P/V). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} con el mismo diluyente; a partir de estas, se sembró 0.1 mL en placas con agar carboximetilcelulosa 1%³⁵ por la técnica de siembra en superficie. Las placas fueron incubadas a 37°C por 48 horas³⁶. Transcurrido el tiempo de incubación se hizo un subcultivo por puntura de los microbios que crecieron en las placas, por duplicado, y se incubó en las mismas condiciones. A una de las placas se adicionó la solución de Rojo de Congo al 1% (P/V), y luego de 15 minutos se retiró el exceso y se adicionó NaCl 1.0 M, dejándolo reposar por 15 minutos más y se retiró el exceso³⁷. La selección de los cultivos celulolíticos se hizo en base a la presencia de halos netos de hidrólisis³⁸ alrededor de cada colonia a partir de la segunda placa sembrada (Tabla 1). Este procedimiento se hizo por triplicado para cada muestra.

Selección secundaria^{16,17}

Cada cultivo que presentó halo de hidrólisis fue reactivado en Agar CMC 1%, pH 6.5, a 37 °C por 24 horas. Posteriormente se sembró por puntura en placas por duplicado e incubado en las mismas condiciones. A una de las placas se adicionó la solución de Rojo de Congo al 1% (P/V), y luego de 15 minutos se retiró el exceso y se adicionó NaCl 1.0 M, dejándolo reposar por 15 minutos más y se retiró el exceso. La selección secundaria de los cultivos celulolíticos se hizo en base al tamaño de los halos netos de hidrólisis alrededor de cada colonia a partir de la segunda placa sembrada. Este procedimiento se repitió tres veces.

Análisis de resultados

Las mediciones promedio de los halos netos de hidrólisis de los cultivos celulolíticos fueron sometidos al análisis estadístico Prueba de Tukey y Duncan para evaluar la diferencia significativa de los resultados.

Identificación bioquímica

A los cultivos bacterianos celulolíticos obtenidos de la selección secundaria se les hizo observaciones macro y microscópicas, en fresco y mediante coloración Gram. La identificación bioquímica de las bacterias seleccionadas se hizo mediante la evaluación de comportamiento metabólico de acuerdo a los manuales de Bergey's de bacteriología sistemática²⁵ y Mac Faddin²⁶.

Determinación de la curva de crecimiento de las bacterias celulolíticas seleccionadas

Cada bacteria fue reactivada en Agar CMC 1 % y se preparó una suspensión bacteriana en solución salina fisiológica estéril (SSFE), equivalente al tubo n°1 del nefelómetro de MacFarland y se inoculó 1 mL a un tubo conteniendo 10 mL de caldo CMC al 0.7%, pH 6.5 a 37°C y se hizo recuentos bacterianos en placa cada 4 h desde las 0 h hasta las 24 h por la técnica de siembra en superficie mediante diluciones seriadas crecientes en cada muestreo y se sembró en agar CMC 1% de 24 a 48 horas.

RESULTADOS

Siete de los 12 cultivos aislados mostraron ser celolocíticos, cuyos halos midieron entre siete y 17 mm (Tabla 1), con promedio de halo ascendente con significancia estadística ($p < 0,05$) entre el Col 1 y C5 (Fig. 1). Los cultivos celolocíticos mostraron ser bacilos Gram +, con colonias de diversa forma (Tabla 2)

Respecto al comportamiento bioquímico, mostraron ser catalasa+, glucosa+, manitol+ y degradadoras del almidón (Tabla 3). Las bacterias fueron identificadas como *Paenibacillus* sp., *Bacillus firmus* y *Bacillus* sp. y mostraron curvas de crecimiento similares en caldo carboximetilcelulosa 0.7%, pH 6.5 a 37°C (Fig 2)

Tabla 1. Comportamiento cualitativo de los 12 cultivos bacterianos aislados a partir de compost del campo experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú, como Celulolítico (+) y No celulolítico (-) mediante la prueba de Rojo de Congo y tamaño de halo neto (mm).

Cultivo	Prueba del rojo de Congo	Halo neto (mm)
Col1	+	12
Col2	-	-
Col3	+	08
C4	+	15
C5	+	17
C6	-	-
C7	-	-
C8	+	08
C9	+	07
C10	+	09
C11	-	-
C12	-	-

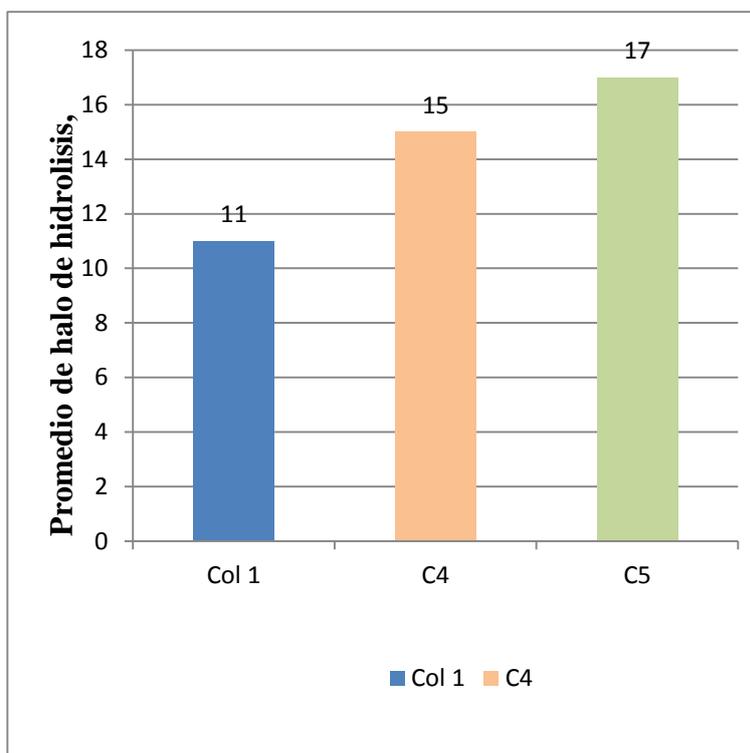


Fig. 1. Promedio de los halos netos de hidrólisis de las tres bacterias celulolíticas Seleccionadas por la técnica del Rojo de Congo del compost del campo experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. ($p < 0,05$)

Tabla 2. Características macroscópicas y microscópicas de los cultivos bacterianos celulíticos aislados y seleccionados de compost del campo experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

Cultivo	Características macroscópicas	Características microscópicas	
		Reacción Gram	Forma
Col 1	Colonias pequeñas, secas, planas, opacas, bordes irregulares y en forma rizoide	Positivo	Bacilos pequeños, espora central, extremos ovalados
C4	Colonias pequeñas, cremosas, planas, bordes irregulares	Positivo	Bacilos pequeños, extremos ovalados, espora central
C5	Colonias pequeñas, cremosas, planas, bordes irregulares	Positivo	Bacilos medianos, extremos ovalados, espora central

Tabla 3. Características bioquímicas (reacción positiva, + o negativa, -) de los cultivos bacterianos celulíticos aislados de compost de residuos orgánicos del campo experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

Prueba	Cultivos		
	Col 1	C4	C5
Catalasa	+	+	+
Glucosa	+	+	+
Hidrolisis del almidón	+	+	+
Citrato	-	-	-
Ureasa	+	-	-
Voges Proskauer	-	-	-
Licuação de la Gelatina a 22°C	-	+	++
Manitol	+	+	+
Movilidad	+	+	+
Indol	-	-	-
Crecimiento en Na Cl 7.5%	++	+	+

Tabla 4. Identificación de los cultivos bacterianos celulíticos aislados y seleccionados a partir del compost de residuos orgánicos del campo experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

Cultivo	Bacteria
Col 1	<i>Paenibacillus</i> sp.
C4	<i>Bacillus firmus</i>
C5	<i>Bacillus</i> sp.

DISCUSIÓN

La selección de los microorganismos celulíticos se logró determinar por los halos de hidrólisis en el medio Agar Carboximetilcelulosa alrededor de la colonia. El método se basó en la capacidad del colorante Rojo de Congo de adherirse a la carboximetilcelulosa tornándose la placa de color rojo, al ser degradado este sustrato por el complejo enzimático celulasa; el área hidrolizada toma un color amarillo

lo cual indica que el colorante no se pudo adherir al polímero que se ha disgregado, lo cual permitió conocer de manera cualitativa la utilización del sustrato carbonado; además fue posible observar el crecimiento de microorganismos que no generan halos alrededor de su colonia, debido posiblemente a que ha utilizado, para su crecimiento, algunos otros componentes como son el extracto de levadura, peptona, o bien los azúcares formados por los microorganismos celulolíticos, en un proceso denominado sinergismo el cual es muy común en los consorcios microbianos^{22,23}.

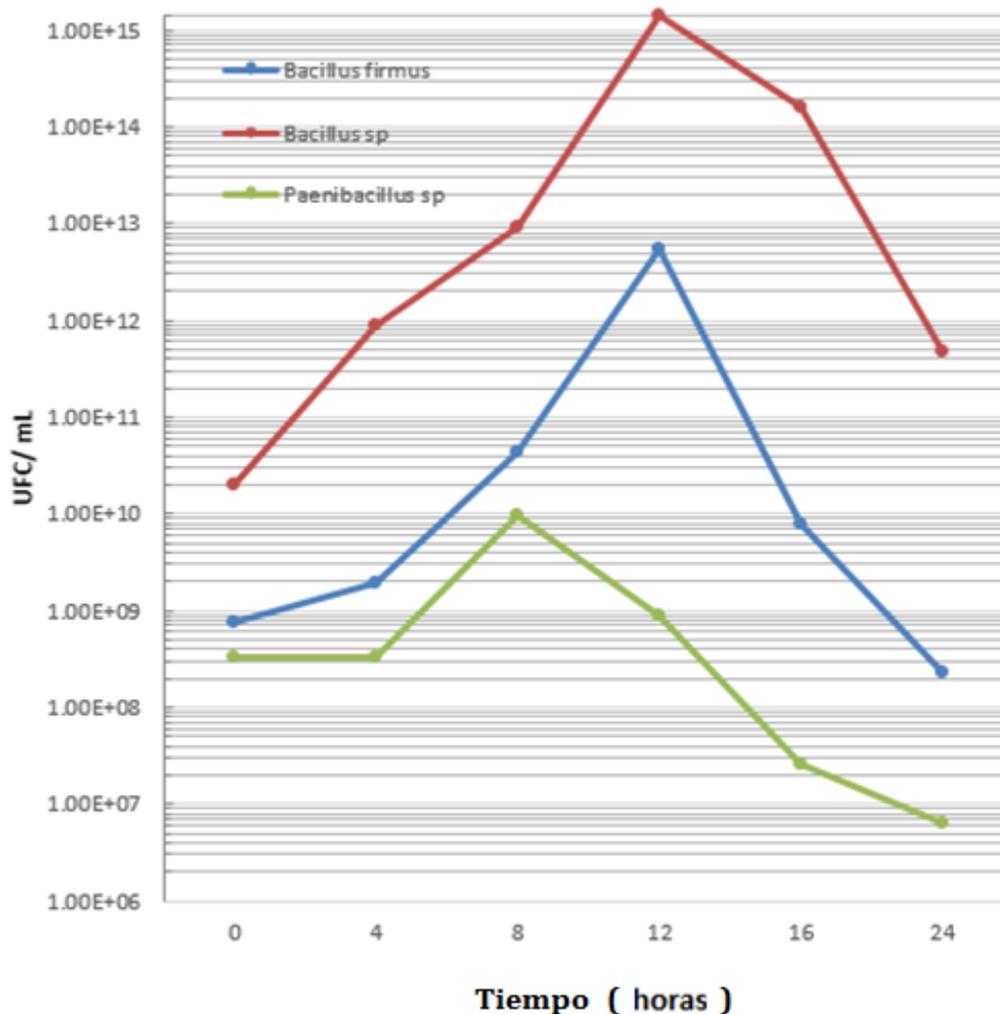


Fig. 2. Curvas de crecimiento de las tres bacterias celulolíticas del campo experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. seleccionadas en caldo carboximetilcelulosa 0.7%, pH 6.5 a 37°C, en relación al tiempo de incubación.

El tamaño de los halos netos de hidrólisis de carboximetilcelulosa 1 % fue diferente para cada cultivo seleccionado. El cultivo C5 fue quien presentó el mayor halo de hidrólisis de 17 mm mientras que el cultivo C9 presentó el menor halo de hidrólisis de 9 mm. Esto es porque hay microorganismos que producen más enzimas celulasas que otras, esto puede deberse al complejo enzimático o al mecanismo de hidrólisis que poseen para degradar este sustrato como es el caso de las bacterias del género *Bacillus* que aparte de producir enzimas termoestables debido a su capacidad de crecer en temperaturas muy elevadas presentan actividad endo β -1,4 glucanasa y exo β -1,4 glucanasa, pero tienen una característica en particular y es la resistencia a ser inhibida por la propia glucosa o celobiosa que producen lo que la convierte en una excelente bacteria productora de enzimas celulasas. Asimismo

actividades elevadas de endoglucanasas se correlacionan con la formación de mayores halos de hidrólisis como lo reportado por Ceroni⁴⁵ que hizo un estudio de correlación entre la actividad enzimática y el halo de hidrólisis obtenido en la selección primaria semicuantitativa en placas^{24,27,28}.

Los cultivos seleccionados fueron Col 1, C4 y C5 quienes mostraron los mayores halos netos de hidrólisis de 11, 15 y 17 mm respectivamente. En tanto que Acharya et al.²³ obtuvieron bacterias termófilas y termotolerantes de una pila de compost, donde *Bacillus subtilis* fue quien mostró la más alta zona de hidrólisis en medio CMC 1% que fue de 21 mm al octavo día de incubación. En un estudio realizado por Ling²⁴ demostró la actividad celulolítica de cepas de *Bacillus thuringiensis* mediante la detección de su capacidad para formar halos en placas de CMC, y como resultado se obtuvo un valor de H / C mayor que 2 (H: halo de hidrólisis diámetro; C: diámetro de la colonia) lo que sugiere que las cepas de *Bacillus* podrían producir celulasas con alta actividades, al tener la capacidad potencial para liberar glucosa a partir de celulosa.

Mediante la prueba de Tukey y Duncan se analizaron las diferencias entre las medias de los halos de netos de hidrólisis de las bacterias sobre el sustrato carboximetilcelulosa al 1.0% en placa, donde se obtuvo que los halos netos de hidrólisis de 15,3 y 16,7 mm de los cultivos C4 y C5 respectivamente no se diferencian significativamente por lo cual presentan el mismo poder degradativo sobre este sustrato. Ambos cultivos fueron los que presentaron los mayores halos netos de hidrólisis pero obtienen el mismo efecto sobre este sustrato; mientras que, el cultivo Col 1 si muestra una diferencia significativa sobre los otros 2 cultivos pero este fue quien presentó el menor halo de hidrólisis entre las tres bacterias seleccionadas.

Los microorganismos aislados y seleccionados Col 1, C4 y C5 en el presente estudio fueron identificados en el laboratorio mediante características morfológicas y pruebas bioquímicas. Así tenemos que se logró describir las características macroscópicas de los cultivos, coloración Gram, y además se realizaron pruebas bioquímicas necesarias de acuerdo al manual de Beryey's²⁵ y Mac Faddin²⁶, determinado así su género y especie, los cuales fueron identificados como *Paenibacillus sp.*, *Bacillus firmus* y *Bacillus sp.*, respectivamente.

Paenibacillus sp. (Col 1) presentó tinción de Gram positiva, glucosa y manitol positivo, hidrolizó el almidón, no licuó la gelatina, tuvo un crecimiento rápido en NaCl al 7.5%, sin reducción del citrato y la prueba de urea fue positiva, en condiciones de aerobiosis. Similares resultados fue encontrado en pruebas bioquímicas realizado por Rodriguez⁴⁹ para la identificación de *Paenibacillus* aisladas de los nódulos de *Lupinus angustifolius* (altramuz azul) para estudios de colonización junto con la bacteria Micromonospora. *Paenibacillus* presenta gran versatilidad en cuanto a su adaptación a diferentes medios; debido a su variabilidad genética ya que presenta segmentos de ADN de distintos microorganismos^{27,28,29}.

Con respecto al género *Paenibacillus* son pocos los estudios sobre su actividad celulolítica como los trabajos que permitieron el aislamiento de *Paenibacillus sp.* de bagazo de caña de azúcar en agar CMC 1% y evaluó su actividad catalítica de enzimas celulasas y de suelos nativos forestales como constituyentes puros de consorcios microbianos y mostró un alto potencial de endoglucanasa en medio sólido y líquido. Este consorcio tuvo un completo potencial de degradación de celulosa ya que mostró altas actividades de endocelulasas, xilanasas y degradación de papel de filtro. Mientras que trabajos realizados por Valenzuela⁵² utilizó a *Paenibacillus barcinonensis* para la purificación, caracterización y clonación de tres enzimas degradadoras de xilano para el empleo industrial³⁰.

Por otra parte, se ha descrito que algunas especies del género *Paenibacillus* actúan como promotoras del crecimiento vegetal, ya que influyen de manera directa en el crecimiento de las plantas al producir fitohormonas, nutrientes, fijar nitrógeno y actuar contra microorganismos patógenos. Un ejemplo lo constituye el empleo de *Paenibacillus polymyxa*, el cual se ha encontrado en la rizófera de diferentes cultivos y en la que tienen la habilidad de secretar sustancias que mejoran el crecimiento de la planta, de fijar nitrógeno y solubilizar los fosfatos⁵³.

Con respecto a su curva de crecimiento *Paenibacillus sp.* muestra que la bacteria desde las 0 hasta las 4 horas tuvo una fase de latencia, en esta fase no hay variaciones en el número de microorganismos; sin embargo, las células no están inactivas ya que se están adaptando al medio, para lo cual sintetizan enzimas. Si bien el número de células no varió, puede ser que éstas aumenten algo de tamaño debido a que se va a producir la división²⁴. Un hallazgo similar se obtuvo en un trabajo realizado por Ghio et al.²⁷ donde evaluó la cinética de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* en agar nutritivo donde observó que la fase de latencia se mantenía constante hasta las ocho horas de crecimiento.

Después de las 4 horas ocurrió un crecimiento exponencial de *Paenibacillus* sp. que finalizó a las 8 horas, alcanzando su fase logarítmica media a las 6 horas. A partir del cual se observa un declive en su crecimiento. Una posible causa por la que este microorganismo dejó de crecer en este medio de cultivo fue la inhibición que se presenta como consecuencia de la acumulación de productos ácidos del metabolismo que cambian el pH del medio de cultivo. Se sabe que los iones H⁺ en numerosas reacciones enzimáticas pueden actuar como inhibidores no competitivos^{29,30}, pero en el presente trabajo no se tuvo en cuenta la influencia del pH, por lo que se recomienda monitorear el valor de pH durante el crecimiento de esta bacteria.

En un estudio que permitió estimar la curva de crecimiento de la bacteria *Paenibacillus lentimorbus* se observó un crecimiento exponencial en donde la concentración de bacilos permanece constante las primeras 24 horas de incubación, después de las cuales se inicia la reproducción exponencial de la bacteria, alcanzando su máxima concentración aproximadamente 62 horas después de inoculado el medio. Se necesitan más estudios sobre esta bacteria ya que son pocos los trabajos realizados para la producción de celulasas y crecimiento en agar CMC.

Bacillus firmus (C4) presentó tinción de Gram positiva, glucosa y manitol positivo, hidrolizó el almidón, tuvo un crecimiento lento en NaCl al 7.5%, produce una lenta licuación de la gelatina (+), no reduce el citrato y la prueba urea fue negativa, en condiciones de aerobiosis. Resultado similar se obtuvo en un trabajo realizado previamente para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de fosfato orgánico y evaluar su capacidad como fijadora biológica de nitrógeno. Esta especie se ha utilizado para la decoloración del poliéster y otras telas, además produce sustancias antimicrobianas activas contra diferentes cepas de *Bacillus* y son capaces de inhibir bacterias sulforeductoras. Esta especie tiene una capacidad de absorción de metales y algunas cepas forman carotenoide²⁹. No se han reportado trabajos de *B. firmus* como degradadora de celulosa pero si se ha reportado como subilizador de fosfatos en el suelo mediante la producción de ácidos como 2-cetoglucónico lo cual promueve el crecimiento vegetal^{28,29,30}.

Con respecto a *Bacillus* sp. (C5) seleccionado este presentó una bioquímica muy similar a *B. firmus* con la única diferencia que tuvo una rápida licuación de la gelatina (++), y no se pudo identificar la especie según el manual de Bergey's²⁵ por las limitaciones de algunas pruebas bioquímicas adicionales. El género *Bacillus* se caracteriza por ser un bacilo Gram positivo, reconocido industrialmente por sus altas tasas de crecimiento y producción de enzimas hidrolíticas; este género ha sido reclasificado muchas veces y algunas de sus especies han sido transferidas al género *Paenibacillus*⁶¹. Estudios realizados con cepas nativas, aisladas de un bosque pantanoso, muestran que *Bacillus*, en condiciones de agitación a 50, 100 y 200 rpm, no presenta actividad sobre su sustrato; es decir no secreta una cantidad considerable de celulasas para ser detectadas por los métodos analíticos²².

Con respecto a las curvas de crecimiento, en la se observa que la fase logarítmica de crecimiento de *Bacillus* sp. y *Bacillus firmus* finaliza a las 12 horas alcanzando su fase logarítmica media a las 6 horas a partir del cual se produce un declive en su crecimiento debido probablemente al consumo total del sustrato carboximetilcelulosa. En esta fase logarítmica la proporción carbono: nitrógeno (C: N) probablemente haya sido la más adecuada, puesto que este es un factor decisivo en la tasa de aprovechamiento del sustrato⁶³. Resultado similar se obtuvo anteriormente en el que se evaluó la fase logarítmica de crecimiento de *Bacillus* sp la cual fue mayor a las 12 horas de crecimiento usando diferentes concentraciones de carboximetilcelulosa en un birreactor agitado. Asimismo la estimulación o inhibición del crecimiento y metabolismo de un microorganismo depende de la disponibilidad y concentración de nutrientes (carbono y nitrógeno principalmente) y de las condiciones ambientales adecuadas; sin embargo, con frecuencia la concentración de fuente de carbono actúa de forma limitante²⁵. En conclusión: (i) se aislaron y seleccionaron 3 bacterias celulolíticas (Col 1, C4 y C5) a partir compost de residuos orgánicos en agar carboximetilcelulosa 1.0%. y mediante la prueba de Rojo de Congo, (ii) no hubo diferencia significativa entre los cultivos bacterianos C4 y C5 pero si entre los cultivos Col 1 y los demás, mediante la prueba estadística de Tukey y Duncan, (iii) los cultivos bacterianos, productores de celulasas, seleccionados a partir de compost de residuos orgánicos fueron *Paenibacillus* sp., *B. firmus* y *Bacillus* sp. y (iv) los géneros bacterianos celulolíticos seleccionados e identificados alcanzaron su fase logarítmica media de crecimiento a las 6 horas en caldo carboximetilcelulosa 0.7 %, pH 6.5 a 37°C. Se recomienda: (i) estandarizar el inóculo de los cultivos celulolíticos para evaluar el halo neto de hidrólisis sobre agar carboximetilcelulosa, (ii) determinar los halos de hidrólisis de las bacterias en carboximetilcelulosa a diferentes temperaturas de incubación, (iii) filtrar la solución de rojo de Congo 1% y mantenerlo en frasco ámbar, (iv) monitorear y controlar el pH

del medio de cultivo durante el crecimiento de las bacterias celulolíticas y (v) relacionar el crecimiento de las bacterias con la producción de celulasas en escala de laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cariello M, Castañeda L, Riobo I, Gonzales J. Inoculante de microorganismos endógenos para acelerar el proceso de compostaje de residuos sólidos urbanos. *J Soil Scie & Plant Nutrit.* 2007; 7(3): 26-37.
2. Nivedita S, Preeti B, Divya T, Richa K. Comparative study of potencial cellulolytic and xylanolytic bacteria isolated from compost and their optimization for industrial use. *J Agroalimentary Processes & Technol.* 2013; 19(3): 284-297.
3. Ryckeboer J, Mergaert J, Vaes K, Klammer S, De Clercq D, Coosemans J, Insam H, Swings J. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann. Microbiol* 2003; 53(4): 349-410.
4. Cruz N, Castellanos D, Argüello H. Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la sabana de Bogotá. *Rev. Colomb. Cienc. Hortíc* 2009; 3(2): 237-249.
5. Fan L, Lee Y. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose in enzymatic hydrolysis. *Biotech & Bioeng.* 1980; 22: 177-199.
6. Dongowski G, Sembries S, Bauckhage K, Will F, Dietrich H. Degradation of apple cell wall material by commercial enzyme preparations. *Nahrung/Food.* 2002; 46: 105-111.
7. Castellanos J, Sandoval A, Urtiz N. Obtención de variantes hiperactivas e inactivas de la endocelulasas cel9 de *Myxobacter* sp. *Acta universitaria* ed. Guanajuato, México; 2006: 22-26.
8. Lynd L, Van Zyl W, MacBride J. Consolidated bioprocessing of cellulose on biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol.* 2005; 66: 506-577.
9. Ramirez P, Cocha J. Degradación de celulosa por actinomicetos termófilos: Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Rev. Perú. Biol.* 2003; 10: 67-77.
10. Bonilla J, Rivas N. Aislamiento y caracterización de una cepa de actinomiceto celulolítico, termófilo moderado y acidófilo. *Revista Científica FCV-LUZ.* 2004; 14(5): 412-418
11. Prasertsan P, Oi S. Production of cellulolytic enzymes from fungi and use in saccharification of palm cake and palm fibre. *World J. Microbiol. & Biotech.* 1992; 8: 536-538
12. Teather R, Wood P. Use of Congo red-polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ. Microbiol.* 1982; 43: 777-780.
13. Hendricks C, Doyle J, Hugley B. A new Solid Medium for Enumerating Cellulose-Utilizing Bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61: 2016-2019.
14. Zhang Y, Himmel M, Mielenz J. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biothecnology Advances.* 2006; 24: 452-481.
15. Esterbauer H, Steiner W, Labudova I, Hemann A, Hayn M. Production of *Trichoderma cellulase* in laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology* 1991; 36:51-65.
16. Lynd L, Weimer P, Van Zyl W, Pretorius I. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002; 3: 506-577.
17. Sazci A, Radford A, Erenler K. Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with dinitrosalicylic acid reagent method. *Journal of Applied Bacteriology.* 1986; 61: 559-562.
18. Ferrer Y, León M, Michelena G, Dustet J.C, Duque A, Ibáñez- M, Tortoló K. Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales. 2011; 45(1): 3-12.
19. Gaitán D. Aislamiento e identificación de microorganismos celulolíticos aislados a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2007.
20. Kasana R., Salwan D., Dhar H., Dutt S., Gulati A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using grams iodine. *Springer Science.* 2008; 57(5): 503-507.
21. Monsalve J, Medina V, Ruiz A. Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca. Medellín. Universidad Nacional de Colombia, DYNA 2006; 73 (150): 21-27.
22. Teather R, Wood P. Use of Congo red-polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ. Microbiol.* 1982;43: 777-780
23. Acharya A, Joshi D, Shrestha K, Battha D. Isolation and screening of thermophilic cellulolytic bacteria from compost piles. *Scientific World.* 2012; 10(10): 43-46.
24. Lin L, Kan X, Yhan H, Wang D. Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Elect J Biotechnol.* 2012; 15(3): 1-7.

25. Bergeys D. Manual of the Determinative Bacteriology 1989 - 2000. Eight Edition. Philadelphia 2000; 2: 540-589
26. Weimer P, Van Zyl, W, Pretorius I. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2002; 66(3): 506-577.
27. Ghio S, Sabaris G, Lia V, Talia P, Cataldi A, Grasso D, et al. Isolation of *Paenibacillus* sp. and *Variovorax* sp. strains from decaying woods and characterization of their potential for cellulose deconstruction. Biochem Mol Biol. 2012; 3(4): 352-364.
28. Fernández G, Hidalgo E, Badilla F. Reproducción y esporulación in vitro de la bacteria *Paenibacillus* (= *Bacillus*) *lentimorbus* para el control de larvas de *Phyllophaga elenans*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 2005; 75: 38-42.
29. Alexander M. Introducción a la Microbiología del suelo. 3^{ra} ed. Manual-moderno. México. 1999: 359.
30. Acuña A. Estudio de la diversidad de hongos y bacterias asociados al intestino de larvas de coleópteros y determinación de sus propiedades lignocelulíticas. Instituto Nacional de Biodiversidad. Costa Rica. 2009.

Correspondencia: Luis Llenque Díaz. Email: lullenque@unitru.edu.pe



Efecto del aceite esencial de *Lantana camara* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Effect of *Lantana cámara* essential oil on growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Alan Venegas del Castillo¹ y María N. Vásquez-Valles²

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

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

Se verificó el efecto del aceite esencial de *Lantana camara* L. sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. El aceite se obtuvo por el método hidrodestilación, a partir del de hojas de *L. camara*, se utilizó concentraciones de 25, 50, 75 y 100% de aceite usando etanol absoluto como diluyente. Para determinar la inhibición de crecimiento antibacteriano se empleó el método de difusión en pozo; añadiendo 25 μ l de cada concentración en pozos de 6 mm de diámetro sobre placas petri con Agar Mueller Hinton los cuales fueron sembrados con *S. aureus* y *E. coli* por superficie, con concentraciones similares al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 UFC/ml); utilizando Vancomicina y Cloranfenicol como controles para *S. aureus* y *E. coli* respectivamente. La lectura se realizó a las 24 horas de incubación a 37°C midiendo el halo de inhibición en cada ensayo. Los resultados mostraron que hay mayor inhibición a mayor concentración del aceite esencial ($p < 0,05$), siendo la concentración de 100%, la que logró inhibición máxima con 33 mm para *S. aureus*. Se concluye que el aceite esencial de *L. camara* muestra efecto inhibitorio sobre el crecimiento del *S. aureus* y *E. coli*.

Palabras clave: Aceite esencial, *Lantana camara* L., crecimiento, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

ABSTRACT

The objective of this research was to demonstrate the effect of essential oil of *Lantana camera* L. on growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The *Lantana* oil was obtained by distillation method from the leaves, and concentrations of 25, 50, 75 and 100% of oil using absolute ethanol as solvent was used. Diffusion in well method was used to determine the antibacterial growth inhibition: it was added 25 μ l of each concentration in wells of 6 mm diameter over Petri dishes with Agar Mueller Hinton which were stocked by surface with *S. aureus* and *E. coli*, at concentrations similar to the tube N° 0.5 of the Nephelometer of Mac Farland, using Vancomycin and chloramphenicol as controls for *S aureus* and *E coli*, respectively. The results showed that there is greater inhibition at higher concentration of essential oil ($p < 0,05$), being the concentration of 100%, to achieve maximum inhibition with 33 mm for *S. aureus*. Concluding that the essential oil of *L. camara* shows inhibitory effect on the growth of *S. aureus* and *E. coli*.

Key Words: Essential oil, *Lantana camara*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, growth

INTRODUCCIÓN

Dadas las cualidades antisépticas de plantas aromáticas y medicinales, sus extractos y aceites esenciales han sido reconocidos desde la antigüedad como fuente de agentes terapéuticos, debido a que producen más de 100 000 metabolitos secundarios, muchos de los cuales son antibacterianos^{1,2,3}.

Lantana camara L (Verbenaceae), popularmente conocida como “Hierba de la maestranza” en el Perú, presenta varios terpenoides, esteres y alcaloides con actividad antipirética y antiespasmódica que le confiere propiedades bactericida, nematicida, antimutagénica insecticida y repelente contra insectos vectores de la malaria. Su aceite es amarillo con olor característico y presenta reconocidos antibacterianos como, limoneno, timol, geraniol, a-fenlandreno, germacreno-D, sabileno, β -cariofileno, E-nerolidol, a-humuleno, linalool, α -terpineol, entre otros^{4,5,6,7,8}.

A nivel mundial, el 70% de enfermedades diarreicas agudas (EDAs) son atribuidas a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) contaminados con microorganismos, tales como, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp, *Escherichia coli* y rotavirus o por intoxicaciones alimentarias como las producidas por *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*^{11,12,13,14}.

S. aureus produce una variedad de toxinas de proteína extracelular, incluyendo las enterotoxinas, síndrome de shock tóxico toxina exfoliativa 1 (TSST-1), toxina (ET), hemolisinas y coagulasa^(25, 26). Las enterotoxinas son un grupo serológico de proteínas diferentes (A, B, C1–3, D, E y F) causantes de intoxicación alimentaria estafilocócica, que es una intoxicación común que resulta del consumo de alimentos que contienen cantidades tan pequeñas como 100 ng de una o más enterotoxinas preformadas^{11,12,13}. Los síntomas tienen un inicio rápido y comprenden náuseas, vómitos con o sin diarrea y dolores abdominales, a su vez se han reportado muertes por infecciones de *S. aureus* debido a los severos desórdenes gastrointestinales¹⁴. Su presencia en alimentos se interpreta como indicador de contaminación por malas prácticas de higiene de los manipuladores de alimentos, convirtiendo a los manipuladores de alimentos en los mayores agentes transmisores, siendo la principal fuente de contaminación por cepas de *S. aureus* asociadas a Intoxicación Alimentaria Estafilocócica (IAE)^{11,14}. La diseminación de *S. aureus* enterotoxigénico desde el manipulador al alimento se puede producir por contacto directo e indirecto, por medio de la descamación normal de piel o por medio de aerosoles procedentes del tracto respiratorio cuando se estornuda, tose o habla, así como falta de higiene en materiales y equipos^{11,13,14}.

Se ha informado que en el Perú, entre 1993 y 2001, se registraron 12 brotes de enfermedades producidas por el consumo de productos lácteos, los cuales comprendieron 11,5% del total de casos de enfermedades transmitidas por alimentos en esos años, estos brotes afectaron a 1 278 personas (de ellas, 24 fallecieron), Entre sus agentes causales se encontró a *S. aureus* con 1,6% de incidencia¹⁸.

E. coli presenta una alta incidencia de casos siendo los niños de 1 a 5 años y los ancianos susceptibles a la infección, utilizando múltiples mecanismos similares a otras bacterias que infectan mucosas, con las etapas de adhesión y colonización de la mucosa, evasión de los mecanismos de defensa, multiplicación y daño tisular⁽³⁹⁾. El ganado de leche o carne sano puede contaminarse durante el proceso de sacrificio y procesamiento⁽⁴⁰⁾.

En el Perú, el primer hallazgo de *E. coli* O157:H7, principal causante de ETA por esta bacteria, se hizo en las heces de una lactante que provenía de Tacna, la cepa presentó los 3 factores de virulencia y en un estudio de 102 muestras de carne molida de bovino en Lima metropolitana encontraron un 22.55% positivo para *E. coli* O157; del total de positivos se analizaron 10 (43.48%) cepas, comprobándose que todas eran *E. coli* O157:H7⁽²⁹⁾. En el 2001, en Tacna, se observó un aumento del número de diarreas disentéricas, con un incremento de 197 a 235 casos, siendo el grupo etario de 1 a 4 años el más afectado con 136 casos (57.8%); de éstos, la mayoría (78.7%) procedían del distrito de Tacna y sólo 10.7% del distrito Alto de la Alianza^{16,17,18}.

Teniendo en cuenta la importancia de las ETAs en la salud de la población, resulta justificable la búsqueda de alternativas de tratamiento con aceites de origen vegetal de especies disponibles. En este contexto, la presente investigación tuvo por determinar el efecto de las concentraciones de 25, 50, 75 y 100% (289.7; 579.4; 869.1 y 1158.8 mg/ml) del aceite esencial de *Lantana camara* L. sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

- Aceite esencial de *Lantana camara* L. “Hierba de la maestranza”
- Cultivos de *Staphylococcus aureus* procedente del Laboratorio de Microbiología y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Trujillo en 2014. Cultivo de *Escherichia coli* procedente del Laboratorio de Análisis de Alimentos y Aguas de la Municipalidad Provincial de Trujillo en 2014.

Obtención e identificación de *Lantana camara*.

Las plantas fueron recolectadas en el Centro poblado El Trópico, Distrito de Huanchaco, Provincia de Trujillo, Departamento La Libertad (a 50 m.s.n.m.), transportadas al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo para la extracción del

aceite esencial. Una muestra de la planta fue llevada al Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo para su identificación taxonómica.

Extracción del aceite esencial^{19,20,21}

Se seleccionaron las hojas que no presentaron lesiones, separándolas de los tallos e inflorescencias⁽⁶⁴⁾. El lavado se realizó con agua corriente para eliminar partículas extrañas, suciedad y restos de tierra, posteriormente fueron puestas a orear por 24 horas y para la extracción. Se empleó el método de Hidrodestilación, para lo cual se utilizó 12 000 g de hojas colocándose 150 g en un matraz esférico esmerilado de 2 000 mL de capacidad. Se procedió a llenar con agua destilada el balón destilador, previa instalación del conducto refrigerante, y se hizo circular el agua a través del mismo. Luego se llevó a calentamiento hasta desprendimiento de un líquido inmiscible conteniendo vapor de agua condensada y el aceite esencial, que fueron recolectados en un embudo de decantación. El tiempo fue de 60 min aproximadamente contándose desde el instante en que cayó la primera gota en la pera de decantación. Se eliminó el agua y se separó el aceite en un frasco de color ámbar.

Almacenamiento

El aceite colectado se guardó en frascos de color ámbar debidamente rotulados, debido a que son inestables fotoquímicamente y se deshidrató con Na₂SO₄ anhidro^(47,58). Se conservó en refrigeración a 4°C hasta el momento de su utilización.

Constantes físicas del aceite esencial

Para determinar la densidad se utilizó un densímetro digital Densymeter DMA35- Aton, obteniendo una densidad de 1.1588 g/ml (1 158.8 mg/ml) y para el Índice de refracción, el refractómetro de círculo Carl Zeiss se obtuvo el valor del índice de refracción: 1.576

Preparación de los inóculos bacterianos^{22,23}.

- **Reactivación de cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli***

Se tomó una azada de cada cultivo conservado, se sembraron en 4 ml de caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI) respectivamente, se llevó a incubar a 37°C por 24 horas. Luego se sembró la suspensión en Agar Baird Parker y MacConkey respectivamente, se llevaron a incubar a 37°C por 24 horas. Se seleccionaron colonias que presentaron características culturales propias. De las colonias se tomó una azada, se realizó la coloración Gram y se observó a 100x. Una vez comprobada la pureza, de la parte restante de la colonia se sembró en agar nutritivo semisólido inclinado.

- **Preparación de inóculo**

Se realizó a partir del cultivo puro de cada bacteria sembrado en Agar nutritivo con 18 horas de incubación. Se hizo una suspensión en 5 ml de agua destilada esteril, a una turbidez equivalente al tubo N° 0.5 del nefelómetro de Mac Farland (1.5 x 10⁸ UFC/ml).

- **Preparación de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *L. camara* L.**

El aceite puro obtenido fue considerado como tratamiento al 100% ($\rho=1158.8$ mg/ml), a partir del cual se realizó diluciones para obtener las concentraciones de 25, 50, 75 y 100% (289.7; 579.4; 869.1 y 1158.8 mg/ml) utilizando como solvente etanol absoluto (control).

Prueba de Inhibición del Crecimiento^{24,28,26}

Método de Difusión en Agar: (i) la actividad antibacteriana se determinó mediante el método de difusión en agar. Se sirvió 25 ml de Agar Müller-Hinton en placas Petri, (ii) las placas se llevaron a secar en la estufa por 10 minutos para eliminar exceso de humedad, (iii) pasados los 10 minutos, se agregó 0,1 ml de suspensión bacteriana y con ayuda de asa de Drigalsky se sembró uniformemente, dejando reposar por 20 minutos, (iv) en condiciones de esterilidad se hizo un pozo con un sacabocado con un diámetro de 6 mm en cada placa, (v) se inoculó 25 μ l de muestra a concentraciones de 25, 50, 75 y 100% (289.7; 579.4; 869.1 y 1158.8 mg/ml) de aceite esencial en cada uno de los pozos de las placas, en otra placa se colocó 25 μ l de etanol absoluto como control; y discos de Vancomicina y Cloranfenicol (30 μ g/disco) siendo el control positivo para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente, (vi) se siguió el mismo procedimiento para el cultivo de *E. coli* con la diferencia que el tiempo de incubación para la preparación del inóculo fue de 7 horas, (vii) luego se dejó en reposo durante una hora, permitiendo una mejor difusión de la muestra en el agar y (viii) después se llevó a incubación a 37°C de 18 a 24 horas⁽⁵⁶⁾

Lectura: La lectura de los resultados se realizó en base a la presencia de los halos de inhibición del crecimiento (mm), formados alrededor de cada pocillo por efecto de la actividad antibacteriana del aceite esencial a concentraciones de 25, 50, 75 y 100%, los cuales se midieron, luego se restó los 6 mm del pozo para ser comparados posteriormente^(59,62). Las mediciones se realizaron en 4 direcciones y se sacó el promedio. Las pruebas se realizaron por triplicado con 5 repeticiones.

Análisis de Datos

Los datos obtenidos fueron sometidos al test de Kolmogorov–Smirnov para determinar si presentan distribución normal (Normal: $p > 0.05$ y No Normal: $p < 0.05$). Como los valores siguieron una distribución normal fueron analizados con la prueba de Anova, para determinar diferencia significativa entre los tratamientos, luego se aplicó la prueba de comparaciones múltiples paramétricas de Tukey con un intervalo de confianza del 95% para determinar diferencia significativa entre concentraciones de aceite y entre el control (Vancomicina y Cloranfenicol); para lo cual se utilizaron los programas estadísticos SPSS Statistics 20.0 para Windows y Microsoft Office Excel 2013.

RESULTADOS

En la **Fig. 1** se presentan los resultados de los diámetros promedios de los halos de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 25, 50, 75 y 100%, (289.1, 579.4, 869.1 y 1158.8 mg/ml) del aceite esencial de *Lantana camara* L., observándose que el mayor efecto inhibitorio lo tiene la concentración de 100% que presenta un halo de inhibición de 33 mm. También se observa que existe diferencia significativa entre las concentraciones estudiadas y que el efecto inhibitorio aumenta a mayor concentración del aceite esencial de *Lantana camara* L.

En la **Fig. 2** Se presentan los resultados de los diámetros promedios de los halos de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a concentraciones de 25, 50, 75 y 100% (289.1; 579.4; 869.1 y 1158.8 mg/ml) del aceite esencial de *Lantana camara* L. Observándose que el mayor efecto inhibitorio lo tiene la concentración de 100% que presenta un halo de inhibición de 11.87 mm. También se observa que existe diferencia significativa entre las concentraciones estudiadas y que el efecto inhibitorio aumenta a mayor concentración del aceite esencial de *Lantana camara* L.

En la **Fig. 3** se presentan los resultados de los diámetros promedios de los halos de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, a las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% (289.1; 579.4; 869.1 y 1158.8 mg/ml) del aceite esencial de *Lantana camara* L. Se observa que es mayor la inhibición del crecimiento en *S. aureus* y menor en *E. coli*.

DISCUSIÓN

Los efectos antimicrobianos de muchas hierbas y especias se han conocido durante siglos, utilizándose para aumentar la vida útil de los alimentos, cuyas propiedades antimicrobianas se le atribuyen a sus principios activos^{23,24}, actuando como agentes inhibidores de una amplia gama de bacterias^{26,27,28}. Tal es el caso del aceite esencial de *L. camara* que es una planta ornamental popular, crece en regiones tropicales y subtropicales^{24,29,30}, es fuente de fósforo y potasio al emplearse como abono, larvicida, pesticida en el control de plagas de insectos, termiticida, repelente de moscas del ganado^{32,33,34,35,36}. Tiene un amplio uso en la medicina tradicional,⁽⁵⁴⁾ para curar gran variedades de enfermedades gastrointestinales, antipirético, diurético, antimalarico, antihelmítico, antirreumática, cicatrizante, antioxidante, antibacteriana, antiinflamatoria, antiulcerogénica, anticancerosa, antitumoral, antimutagénico, enfermedades hepáticas, purificador de la sangre, bronquitis, tos, asma, ⁽¹⁴⁾ contra la lepra y sarna^{27,28,35,36}.

La caracterización de su aceite esencial y sus metabolitos con actividad antimicrobiana permitieron identificar los componentes mayoritarios, los cuales presentan actividad antimicrobiana son el β -cariofileno, zingibereno, germacreno-D, γ -curcumeno, linalol, y α -humuleno, limoneno, valecene, ácido lantico, Sabineno, α -caryophyllene, davanone^{37,38,39,40}

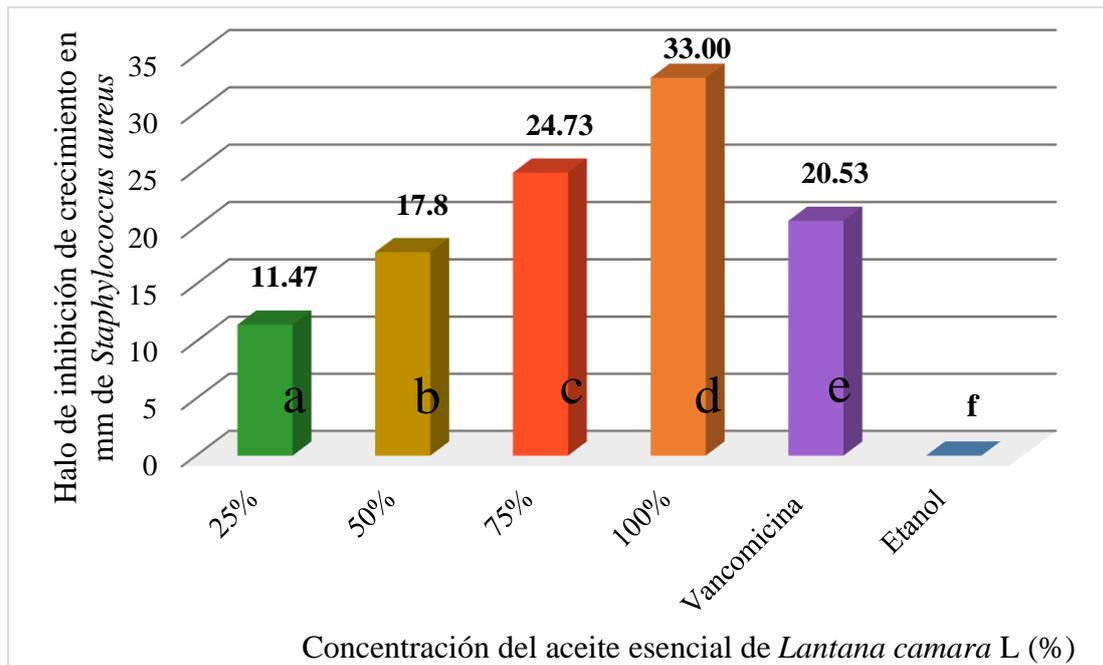


Fig. 1. Inhibición del crecimiento en mm de *Staphylococcus aureus* frente a las concentraciones de 25, 50, 75 y 100% del aceite esencial de *Lantana camara* L. y de los grupos control Vancomicina y etanol. Letras diferentes presentan diferencia significativa entre grupos ($p < 0.05$)

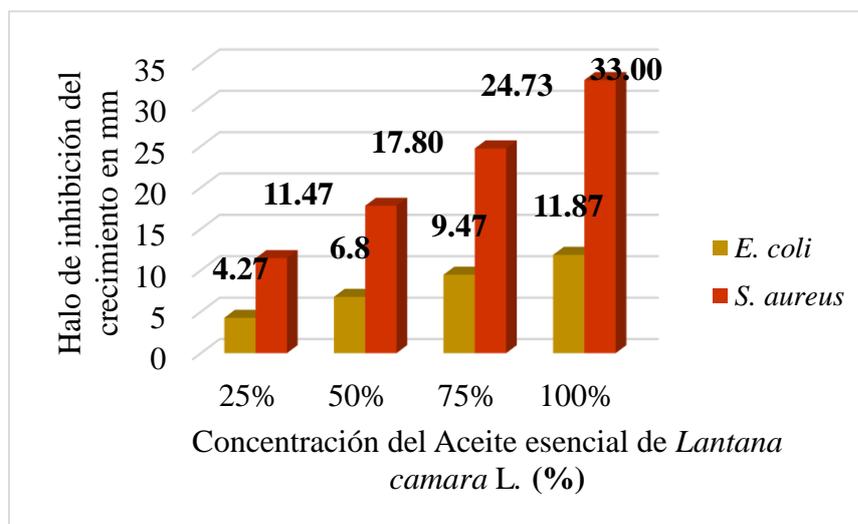


Fig.2. Inhibición del crecimiento en mm de *Escherichia coli* frente las concentraciones de 25, 50, 75 y 100% del aceite esencial de *Lantana camara* L. y de los grupos control Cloranfenicol y etanol. ($p < 0,05$)

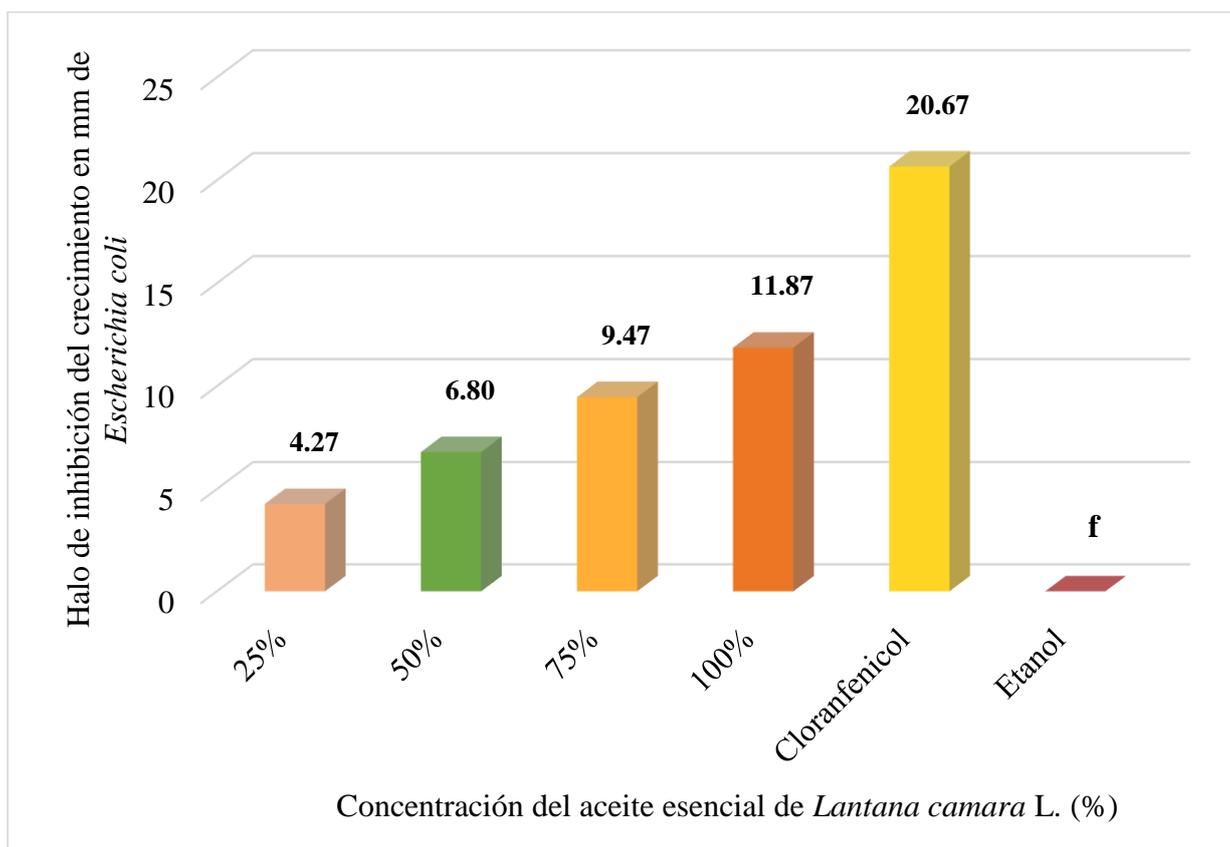


Fig. 3. Comparación de diámetros promedios de los halos de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* a las concentraciones de 25, 50, 75 y 100% frente al aceite esencial de *Lantana camara* L.

S. aureus es sensible frente a las concentraciones de 25 y 50% del aceite esencial de *L. camara*, con formaciones de halos de inhibición del crecimiento de 11.47 y 17.80 mm, respectivamente; pero estos halos son menores si los comparamos con el halo de inhibición del crecimiento formado por el antibiótico Vancomicina (control) con 20.53 mm ($p < 0,05$). La concentración de 75% (869,1 mg/mL) presentó un halo de inhibición del crecimiento de 24.73 mm, con un valor de $p < 0,05$ con respecto al halo formado por Vancomicina que fue de 20.53 mm, esto indica que la concentración de 75% es significativamente mayor al formado por el control. Un mejor resultado presentó la concentración de 100% (1158.8 mg/mL) con un diámetro de 33 mm, mayor en comparación con el control ($p < 0,05$), indicando que existe diferencia significativa con el formado por la Vancomicina, siendo esta concentración eficazmente sensible para *S. aureus*.

La inhibición con mayor significancia se observa a una concentración de aceite esencial más alta (100%). A bajas concentraciones se observó que el efecto inhibitorio es reducido con respecto al crecimiento de microorganismo, en comparación con el control. Este resultado permite asegurar que *S. aureus* es significativamente más sensible a las concentraciones de 75 y 100% (869,1 y 1158.8 mg/ml) del aceite esencial de *L. cámara* que el antibiótico Vancomicina. Estos resultados coinciden con estudios realizados previamente respecto de la actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *K. Pneumoniae* y *E. coli* donde se encontraron que el aceite esencial es efectivo contra *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

Se ha indicado que la actividad antibacteriana está relacionada con la proporción químicas de los compuestos principales, así como de los componentes menores, donde la actividad antimicrobiana puede atribuirse a varios compuestos activos, así como a los efectos sinérgicos entre ellos, la variabilidad de quimiotipos, ciclo vegetativo, proceso de obtención del aceite, las partes de la planta con sus estadios

de desarrollo, la ubicación geográfica, el clima, solubilidad del aceite, el rango de difusión en el agar, la evaporación, concentración de los componentes activos y tipo de bacterias utilizadas^{31,36,39,40,41}

Los aceites esenciales interactúan afectando a la membrana plasmática, interfiriendo en la cadena respiratoria con la producción de energía (ATP); de modo que si la integridad de la membrana es destruida, entonces las propiedades de barrera, matriz para las enzimas y transductor de energía se ven comprometidos.

E. coli presenta menor inhibición del crecimiento frente al aceite de *L. camara* para las concentraciones estudiadas de 25, 50, 75 y 100%, pues los halos formados fueron de 4.37; 6.8; 9.47 y 11.87 mm respectivamente, presentando un menor diámetro, en comparación con el halo de inhibición del crecimiento formado por el antibiótico Cloranfenicol (control) que fue 20.67 mm y aunque *E. coli* muestra cierto grado de inhibición, las concentraciones no son eficaces comparándolas con el control ($p < 0.05$). Se ha reportado actividad antimicrobiana de este aceite frente a *E. coli* y se ha observado que *E. coli* presentó halos de inhibición del crecimiento con un promedio de 10 mm.

Al comparar los halos de inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* frente a las concentraciones de 25, 50, 75 y 100% del aceite esencial de *L. camara* L., se comprobó que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambas bacterias, es decir se observa que *S. aureus* presenta mayor grado de sensibilidad frente al aceite esencial en comparación a *E. coli* en todos los tratamientos. Estos resultados concuerdan con investigaciones previas donde se obtuvo zonas de inhibición en *E. coli* de 13 mm, *P. aeruginosa* 15 mm, *S. aureus* 22 mm, inhibiciones de 24 y 20 mm para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente; actividad inhibitoria del aceite esencial de *L. camara* L. contra, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, a concentraciones de 500, 500 y 250 mg/mL, respectivamente; con el extracto de reporto halos de inhibición en *S. aureus* de 14 mm (200 mg/mL), *Pseudomona* sp. 16 mm (190 mg/ml) y *B. cereus* 16 mm (210 mg/ml), y al trabajar con extractos de hojas y encontraron halos de inhibición de 21,7 mm contra *S. aureus*^{26,29,39,40,41}. Al mismo tiempo, se ha descrito actividad contra *S. aureus*, mas no contra *E. coli*, tal es el caso de Kurade *et al*²⁵ y Benites *et al*³², Dubey *et al*⁴⁰; Barreto *et al*²², de igual manera se reportaron casos donde *S. aureus* no presenta inhibición del crecimiento.

Según los resultados obtenidos con *S. aureus* y *E. coli* en comparación con los hallazgos de otras investigaciones, si bien coinciden con el mismo efecto inhibitorio, la eficacia del aceite esencial de *L. camara* resulto ser mayor en el caso de *S. aureus*, esto se debió posiblemente a la variación en su composición^{39,40}. El mecanismo de acción de los terpenos y sesquiterpenos no se entiende completamente, se especula que participan en la disrupción de la membrana por los compuestos lipofílicos, describiendo 3 posibles vías de acción: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica. Como era de esperarse las bacterias Grampositiva (*S. aureus*) fue más susceptibles al efecto antimicrobiano^{13,17}.

E. coli en el trabajo presenta menor inhibición del crecimiento al aceite de *L. camara* L. que *S. aureus*, estos resultados son similares a los obtenidos previamente; esta diferencia se debería que las bacterias Gramnegativas, muestran una resistencia intrínseca a una gran variedad de aceites esenciales, la que se relaciona con la superficie hidrófila de su membrana externa, rica en lipopolisacáridos que forman una barrera impermeable en contra de los agentes tóxicos, impidiendo el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana externa debido a la acción de las proteínas porinas. Sin embargo, las macromoléculas hidrofóbicas como la de los componentes de los aceites esenciales, son incapaces de penetrar la barrera. Esto lleva a pensar que el pequeño halo de inhibición producido por el aceite esencial de *L. camara* L. en *E. coli* puede deberse a su contenido de terpenoides (monoterpenos y sesquiterpenos), que según investigaciones anteriores, son identificados como los componentes mayoritarios en las fracciones volátiles de las hojas y flores^{18,26}.

De acuerdo a los resultados obtenidos y basándose en trabajos anteriores, se puede afirmar que *S. aureus* presento mayor inhibición del crecimiento frente al aceite de *L. camara* L. que *E. coli* y que este efecto inhibitorio contra bacterias Gram positivas se debería a los componentes propios del aceite así como también a la estructura y constitución de las membranas bacterianas^{19,22,17}. Quedando demostrado que la familia del genero Verbenácea presenta potencial en la medicina por su efecto antimicrobiano en bacterias de interés clínico y alimentario, en especial *L. camara* L. que presenta diversos usos no solo para la medicina sino también en la industria alimentaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000; 88(2): 308-316.
2. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International J Food Microbiol;* 2004; 94(3): 223-253.
3. Medeiros LB, Rocha M, Lima S, Sousa G, Citó A, et al. Chemical constituents and evaluation of cytotoxic and antifungal activity of *Lantana camara* essential oils. *Rev Brasileira Farmacog.* 2012; 22(6): 1259-1267.
4. Matienzo Y, Ramos B, Rijo E. Revisión Bibliográfica Sobre *Lantana camara* L. Una Amenaza para la ganadería. *Fitosanidad.* 2003; 7(4): 45-55.
5. Stashenko EE, Jaramillo BE, Martínez JR. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev Acad Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.* 2003; 27(105): 579-597.
6. Caroprese JF, Parra MI, Arrieta D, Stashenko E. Anatomía microscópica y metabolitos secundarios volátiles en tres estadios del desarrollo de las inflorescencias de *Lantana camara* (Verbenaceae). *Revista de Biología Tropical.* 2011; 59(1): 473-483.
7. Romeu C, Pino J, Martí MP. Algunas consideraciones acerca de la composición química del aceite esencial de *Lantana camara* L. presente en Cuba. *Fitosanidad* 2004; 8(3): 59-63.
8. González A, Villalobos V, Pereyra G, Rengifo E, Marín O, Tezara W. Ecophysiological comparison of three species of the genus *Lantana* L. (Verbenaceae). *Acta Bot Venezuelica.* 2009; 32(2): 417-432.
9. Ramírez LS, Marín D. Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales y extractos etanólicos utilizando métodos de difusión en agar y dilución en pozo. *Scientia et Technica.* 2012; 12(50): 152-157.
10. Naffa RG, Bdour SM, Migdad HM, Shehabi AA. Enterotoxigenicity and genetic variation among clinical *Staphylococcus aureus* isolates in Jordan. *J Medical Microbiol.* 2006; 55(2): 183-187.
11. Smith A, Stewart J, Fyfe L. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and α -toxin by *Staphylococcus aureus*. *J Clinical Microbiol.* 2004; 53(10): 1023-1027.
12. Castro N, Chaidez C, Rubio W, Valdez JB. Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. *Rev Cubana de Salud Pública.* 2004; 30(1): 83-86.
13. Jordá GB, Marucci RS, Guida AM, Pires PS, Manfredi EA. Portación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos. *Rev Argentina Microbiol.* 2012; 44(101-104).
14. García C, Hallin M, Deplano A, Denis O, Sihuíncha M, Groot R, Gotuzzo E, Jacobs J. *Staphylococcus aureus* causing tropical pyomyositis, amazon basin, Peru. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(1): 123-125.
15. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev Microbiol.* 2004; 2(2): 123-140.
16. Terrance MA, Rafiq A, Chase-Topping M, Kalchayanand N, Schmidt JW, et al. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 Strains Isolated from Supershedding Cattle. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79(14): 4294-4303.
17. Beatty ME, Adcock PM, Smith SW, Quinlan K, Kamimoto LA, Rowe SY, Scott K, Conover C, Varchmin T, Bopp CA, Greene KD, Bibb B, Slutsker L, Mintz ED. Epidemic diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis.* 2006; 42(3): 329-334.
18. Huapaya CB, Huguet J, Suárez V, Torres Y, Montoya Y, et al. Primer aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 Enterohemorrágica en el Perú. *Rev Peruana Med Exp Salud Pública,* 2001; 18(2): 38-39.
19. Kurade NP, Jaitak V, Kaul VK, Sharma OP. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Lantana camara*, *Ageratum houstonianum* and *Eupatorium adenophorum*. *Pharmaceutic Biol.* 2010; 48(5): 539-44.
20. Sousa EO, Costa JGM. Genus *Lantana*: chemical aspects and biological activities. *Brazilian J Pharmacogn.* 2012; 22(5): 1115-1180.
21. Shankar SD, Gopal BB, Hota P. *Lantana camara* Linn leaf extracts mediated green synthesis of gold nanoparticles and study of its catalytic activity. *Appl Nanoscience.* 2015; 5(3): 343-350.
22. Barreto FS, Sousa EO, Campos AR, Costa JGM, Rodrigues FFG. Antibacterial Activity of *Lantana camara* Linn and *Lantana montevidensis* Brig Extracts from Cariri-Ceará, Brazil *J Young Pharmacists.* 2010; 2(1): 42-44.
23. Sundufu AJ, Shoushan H. Chemical composition of the essential oils of *Lantana camara* L. occurring in South China. *Flavour and Fragrance J* 2004; 19(3): 229-232.
24. Bhargava S, Agrawal DD, Agrawal OP. Repellent Activity of Essential Oil and Leaf extract of *Lantana camara* L. In Laboratory condition. *Intern J Theoret & Appl Sci.* 2013; 5(1): 170-174.

25. Randrianalijaonaa JA, Ramanoelinaa PAR, Rasoarahonaa JRE, Gaydoub EM. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L.: Essential oils from Madagascar. *Analytica Chimica Acta*. 2005; 545(1): 46–52.
26. Sousa EO, Barreto FS, Rodrigues FFG, Campos AR, Costa JM. Chemical composition of the essential oils of *Lantana camara* L. and *Lantana montevidensis* Briq. and their synergistic antibiotic effects on aminoglycosides. *J Essential Oil Res*. 2012; 24 (5): 447-452.
27. Kasali AA, Ekundayo O, Paul C; Koenig WA, Eshilokun AO, Yadau. Essential Oil of *Lantana camara* L. var. *aculeata* from Nigeria. *J Essential Oil Res*. 2004; 16 (6): 582-584.
28. Randrianalijaona J, Ramanoelina P, Rasoarahona, J. Chemical Compositions of aerial part essential oils of *Lantana camara* L. chemotypes from Madagascar. *J Essential Oil Res* 2006; 18(4): 405-407.
29. Rani MJ, Chandramohan, Narendran, Sudha. Identification of Sesquiterpenes from *Lantana Camara* leaves. *Internat J Drug Develop & Res* 2013; 5(1): 135-144.
30. Sousa EO, Almeida TS, Menezes IRA, Rodrigues FFG, Campos AR, Lima SG, da Costa J. Chemical Composition of Essential Oil of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) and Synergistic Effect of the Aminoglycosides Gentamicin and Amikacin. *Records of Natural Products*. 2012; 6(2): 144-150.
31. Jawonisi IO, Adoga GI. Chemical Constituents of Essential Oil of *Lantana camara* Linn. Leaves. *British J Pharmacol & Toxicol*. 2013; 4(4): 155-157.
32. Kumar VP, Chauhan NS, Padh H, Rajani M. J Ethnopharmacol. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2006; 107(2): 182-188.
33. Benites J, Moiteiro Graça C, Rojo M, López L, Venâncio J, Ramalho F, et al. Composition and biological activity of the essential oil of Peruvian *Lantana camara*. *J Chilean Chem Society*. 2009; 54(4): 379-384.
34. da Costa JGM, de Sousa EO, Rodrigues FFG, de LimaSG, Braz-Filho R. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. *Rev Brasileira Farmacogn*. 2009; 19(3): 710-714.
35. Mohapatra TK, Dash V, Behera SK, Parida B, Sahoo AM, Nayak RR, et al. Evaluation of Anthelmintic and Antimicrobial Activity of the Leaves of *Lantana camara*. *Intern Res J Pharmaceut Sci*. 2011; 02(01): 10-14.
36. Deepak G, Silviya S, Kishwar HK. Biochemical compositions and antibacterial activities of *Lantana camara* plants with yellow, lavender, red and white flowers. *EurAsian J BioSciences*. 2009; 3:69-77
37. Seth R, Mohan M, Singh P, Haider SZ, Gupta S, Bajpai I, Singh D, Dobhal R. Chemical composition and antibacterial properties of the essential oil and extracts of *Lantana camara* Linn. from Uttarakhand (India). *Asian Pacific J Trop Biomed*. 2012; 2(3): 1407-1411.
38. Mani LM, Sankar C, Dilip C, Azeem AK, Raj D, et al. Antimicrobial studies on extracts of *Lantana Camara* Linn. *Scholars Res Library*. 2010; 2(5): 80-82.
39. Naz R, Bano A. Phytochemical screening, antioxidants and antimicrobial potential of *Lantana camara* in different solvents. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2013; 3(6): 480-486.
40. Dubey M, Sharma SN, Sengar R, Bhadauria S, Gautam RK. In vitro antibacterial activity of *Lantana camara* leaves hidrosol. *J Pharmacy Res*. 2011; 4(11): 3972-3974.
41. Pradeep BV, Tejaswini M, Nishal P, Pardhu G, Shylaja S, Kumar K. Phytochemical screening and antimicrobial activities of plant extract of *Lantana camara*. *J Environ Biol*. 2013; 34(3): 645-649.

Correspondencia: Nelly Vásquez Valles. Email: nvasquez@unitru.edu.pe



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}

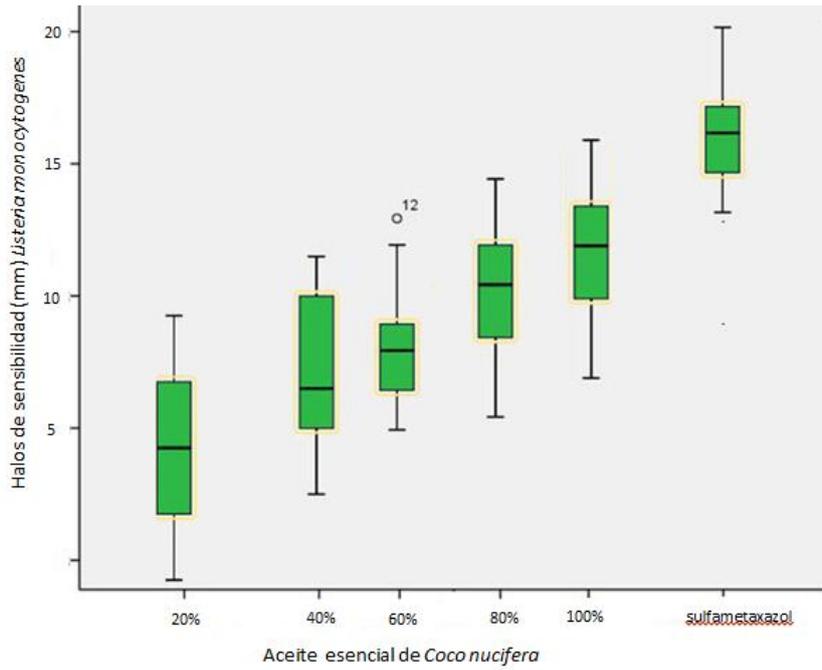


Fig. 1: Variación del promedio de los halos de sensibilidad (mm) de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cocos nucifera*. ($p < 0.05$).

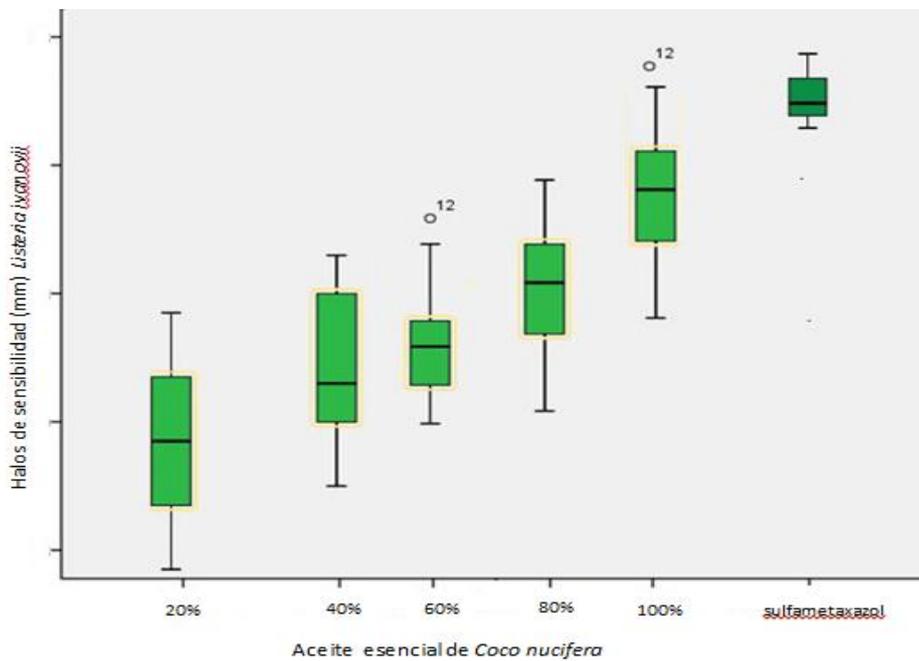


Fig. 2: Variación del promedio de los halos de sensibilidad (mm) de *Listeria ivanovii* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cocos nucifera*. * $p < 0,05$.

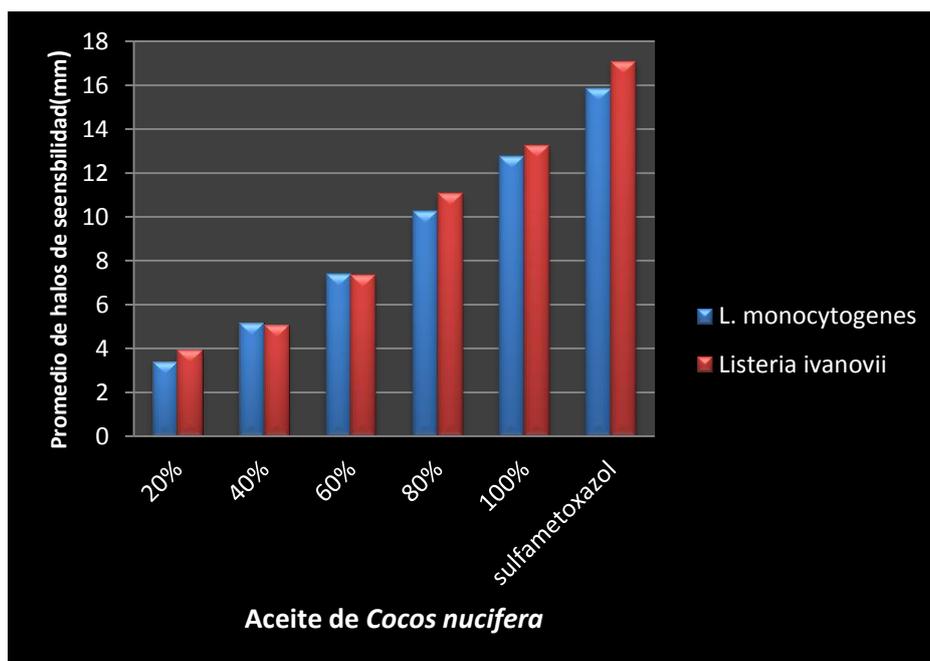


Fig. 3: Comparación de promedios de los halos de sensibilidad (mm) de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria ivanovii* frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cocos nucifera* ($p > 0,05$). *No existe diferencia significativa entre los grupos de *L. monocytogenes* y de *L. ivanovii*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



Artículo Original

Actividad antibacteriana in vitro de las nanopartículas del rizoma de *Curcuma longa* sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1

In vitro antibacterial activity of nanoparticles of *Curcuma longa* on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1

Javier Arica-Pajares¹, Ana León-Matos¹, Jersson Ascate-Lezama¹ y Julio Arellano²

¹ EAP de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú. ² Departamento académico de Química Biológica y Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Biológicas – UNT.

RESUMEN

Se evaluó el efecto antibacteriano que tienen los curcuminoides del rizoma de *Curcuma longa* ("cúrcuma") sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1, al aumentar su biodisponibilidad mediante su obtención a nivel de nanopartículas. Se obtuvo el polvo de 3kg de rizomas de cúrcuma. Dichos rizomas fueron previamente lavados, pelados, picados y dejados a secar durante una semana a 45 – 50 °C, para luego ser molidos hasta obtener un polvo. Posteriormente para la obtención de las nanopartículas se utilizó la técnica de nanoprecipitación rápida utilizando una cabina cerrada de mezcla por choque de chorros modificada, en el cual 25 mg del polvo de cúrcuma se disolvieron en 2.5 mL de un solvente orgánico miscible en agua (en este caso etanol absoluto) los cuales se mezclaron con un antisolvente (agua desionizada). Las nanopartículas de cúrcuma con un diámetro menor a 100 nm siendo el diámetro mínimo de 29 nm, los cuales son reproducibles en términos de tamaño de partículas y distribución. Para la detección de los curcuminoides se utilizó un espectrofotómetro UV-vis obteniéndose un rango máximo de longitud de onda entre 423 a 430 nm. En conclusión, a la concentración de 100% de nanopartículas hay efecto antibacteriano sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* CMH-1.

Palabras clave: *Curcuma longa*, nanoprecipitación rápida, Nanopartículas, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the antibacterial effect of curcuminoids of *Curcuma longa*'s rhizome ("turmeric") on growth of *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1, increasing its bioavailability by obtaining nanoparticles from turmeric. For which, powder of 3Kg of turmeric rhizomes was obtained. These rhizomes were previously washed, peeled, chopped and left to dry for a week at 45-50 °C for then be grounded to obtain a powder. Subsequently to obtain nanoparticles, Flash nanoprecipitation technique was use, using a confined impingement jets mixer modified in which 25 mg of turmeric powder were dissolved in 2.5 mL of an organic solvent miscible in water (in this case absolute ethanol) which was mixed with an anti-solvent (deionized water). Turmeric nanoparticles were obtained with a diameter less than 100 nm being the minimum diameter of 29 nm. They are reproducible in terms of particle size and distribution. An UV-vis spectrophotometer was used to obtain a maximum wavelength range between 423-430 nm for detection of curcuminoids. It was concluded that a concentration of 100% of nanoparticles has antibacterial effect on the growth of *P. aeruginosa* CMH-1.

Key words: *Curcuma longa*, Flash nanoprecipitation, Nanoparticles, *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa, bacteria Gram negativa, es responsable de una amplia variedad de infecciones agudas y crónicas, tales como: bacteremia, neumonía, infecciones producidas en pacientes con heridas de quemaduras. Asimismo, debido a su elevada resistencia intrínseca y adquirida a los antibióticos por la formación de biopelículas y producción de múltiples factores de virulencia¹; dificulta los tratamientos existentes para su control.

Curcuma longa, mejor conocida como “cúrcuma”, “palillo” o “azafrán indio”, es una planta herbácea, perenne de origen asiático que pertenece a la familia Zingiberaceae. Se cultiva principalmente en China, India, Indonesia, Jamaica² y Perú³. Esta planta ha sido utilizada por siglos en la medicina indígena para el tratamiento de una variedad de condiciones inflamatorias⁴, como antibacteriano, antifúngico y antiviral⁵.

La curcumina, principal componente de *C. longa*, junto con otros dos compuestos de la misma naturaleza (demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina) son extraídos del rizoma de la planta². Estos curcuminoides no producen efectos secundarios en el hombre y en animales, además no son tóxicos a altas dosis^{6,7}; sin embargo, uno de los mayores problemas es su biodisponibilidad^{8,9}. En consecuencia, se han desarrollado diversas formulaciones, tales como nanopartículas, liposomas, micelas y complejos fosfolipídicos; las cuales han conseguido aumentar la biodisponibilidad de la curcumina así como mejorar su permeabilidad y resistencia a procesos metabólicos^{10,11}.

Las nanopartículas reciben actualmente una enorme atención como herramienta para la administración de fármacos y compuestos lipofílicos. Estas se pueden producir mediante una técnica simple denominada nanoprecipitación rápida (flash nanoprecipitation) (FNP)¹².

Han y col. emplearon un sistema cerrado de mezcla por choque de chorros con dilución (Confined Impingement Jets Mixer with Dilution. CIJ-D-M), que es más simple que el diseño original propuesto por Johnson and Prud'homme¹³. El diseño requiere un impulso de flujo igual con dos chorros opuestos, uno conteniendo el compuesto hidrofóbico en un solvente orgánico y el otro, conteniendo un antisolvente, generalmente agua. La etapa de dilución posterior en el nuevo diseño permite un rápido enfriamiento con una alta concentración de antisolvente, que mejora la estabilidad de la nanopartícula¹². Chow y col. utilizaron el CIJ-D-M para producir nanopartículas irregulares de curcumina con un tamaño menor a 100 nm¹⁴.

En el presente informe se presentan los resultados de una investigación dirigida a demostrar que mediante el uso de nanopartículas del rizoma de *C. longa*, obtenidas por nanoprecipitación rápida, aumenta la biodisponibilidad de los curcuminoides y, por consiguiente, éstos incrementan su efecto antibacteriano contra *P. aeruginosa*.

MATERIAL MÉTODOS

Material biológico:

- Rizomas de *Curcuma longa* obtenidos del mercado “Mayorista” (Trujillo, Perú), proveniente de la selva peruana.
- Cultivo puro de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1, proporcionado por el Centro Médico Hematológico – Piura (Trujillo, Perú) con una confiabilidad de identificación de 99,99% de, mediante el equipo MicroScan autoSCAN-4 System.

Obtención del polvo de *Curcuma longa*:

Se lavaron 3 kg de rizomas de cúrcuma con agua de caño para eliminar impurezas, a continuación se dejaron secar a temperatura ambiente (23°C - 25 °C) y luego se procedió a pelarlos con un pelador de cocina. Una vez pelados se cortaron en trozos pequeños para después dejarlos secar en una caja de tecnopor con un foco de 60 wattz dentro, simulando un horno de unos 45°C – 55°C por el lapso de una semana. Finalmente se molió en un molino de discos hasta obtener un polvo lo más fino posible.

Extracción de curcuminoides:

Se adicionó 1g de polvo de cúrcuma por cada 100 mL de etanol absoluto (PANCREAC QUIMICA SA).

Obtención de suspensión nanopartículas del rizoma de *Curcuma longa*¹⁴:

Se utilizó un sistema similar al CIJ-D mixer (“Confined Impingement Jets mixer” / Cabina cerrada de mezcla por choque de chorros), ¹² elaborado por la empresa SERMETAME S.R.L. Siguiendo la técnica de nanoprecipitación rápida¹³, se empleó etanol absoluto como solvente orgánico de la cúrcuma y agua desionizada (Obtenida por desionizador HIDROMAQ) como antisolvente. La mezcla resultante se dejó caer en 45 mL de agua desionizada para aumentar la sobresaturación

Caracterización de las nanopartículas:

La caracterización de las nanopartículas se realizó en la Sección de Nanociencia y Nanotecnología del Laboratorio de Física de Materiales. La presencia de los curcuminoides en la suspensión se comprobó mediante espectrofotometría, utilizando un Espectrofotómetro UV/Vis/NIR Lambda 750s marca PerkinElmer. Y el tamaño promedio de las nanopartículas se determinó mediante la Técnica de Dispersión dinámica de Luz (Dynamic light scattering / DLS), para lo cual se utilizó el equipo NICOMP Nano Z3000.

Reactivación del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1:

El cultivo puro de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1 brindado en el medio de transporte Amies se reactivó sembrando la bacteria en una placa de Petri con Agar Müller-Hinton y puesto a incubación a 37°C/14horas. Luego se conservó el cultivo en placa a 4 °C.

Determinación de la fase log de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1:

Se realizó una suspensión del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1 en Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFE) equivalente al tubo N°0,5 del Nefelómetro de McFarland. Luego se extrajo 1mL de esa suspensión y se lo adicionó a un sistema de agitación continuo con 99 mL de caldo nutritivo y se incubó a 37°C. A los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 horas, se extrajeron muestras de 0,5 mL y se realizaron diluciones seriadas, de las cuales se sembraron 1 mL por incorporación en su respectiva placa de Petri, estas se incubaron a 37°C/24h. Posteriormente se realizó el recuento de colonias en cada placa y finalmente se construyó la curva de crecimiento, de la cual se determinó la duración de la fase logarítmica de la bacteria.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI):

Se siguió el protocolo establecido en Clinical and Laboratory Standards Institute ¹⁵.

Preparación de las placas mediante el método de difusión:

Se preparó una suspensión bacteriana de acuerdo al estándar del tubo N°0.5 del Nefelómetro de McFarland y se sembró, por superficie, 0.1 mL de esta suspensión en agar Müller Hinton. Posteriormente se realizaron 4 pocillos equidistantes en el agar a los cuales se les agregó una solución de nanopartículas de curcuminoides (a dos pocillos), una solución al 5% de etanol absoluto en agua desionizada y agua desionizada, respectivamente en los pocillos 1, 2, 3 y 4; siendo los 2 últimos controles. Además se colocó un disco de antibiótico contra *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1 en el centro de la placa a manera de control positivo. Finalmente las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. El ensayo se repitió 3 veces.

Evaluación de los halos de inhibición:

Luego de las 24 horas de incubación, se procedió a medir los halos de inhibición.

RESULTADOS

Mediante el método de “Flash Nanoprecipitación” se obtuvieron nanopartículas con un diámetro promedio de 106.1 nm con un 100 % en número (Fig. 1).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de la suspensión de nanopartículas de curcuminoides, a las diferentes concentraciones empleadas sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* CMH-1, determinó que sólo la concentración de 100% tuvo efecto antibacteriano (se observó turbidez en los demás tubos, Fig. 2); asimismo, el resultado de la evaluación realizada mediante el método de difusión en disco confirmó el efecto antibacteriano de los curcuminoides al 100%, mediante una zona de inhibición de 14.5 mm en Agar Müller Hinton (Fig. 3).

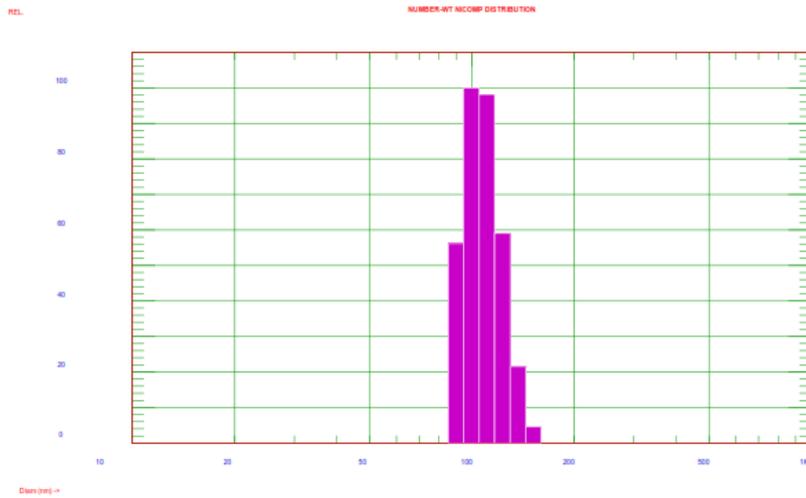


Fig. 1: Tamaño de las nanopartículas de los rizomas de *Curcuma longa*, medidas por DLS.

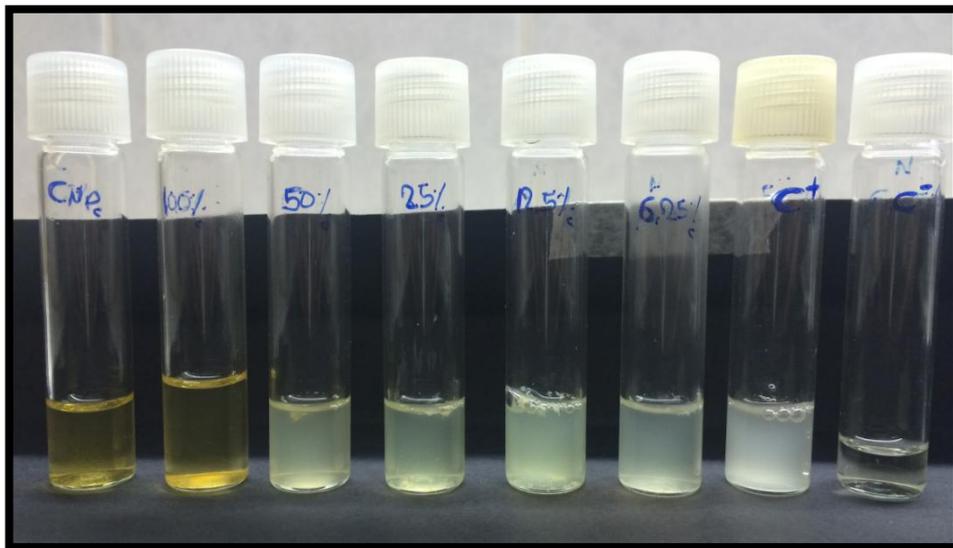


Fig. 2: CMI de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1 en Caldo Nutritivo.

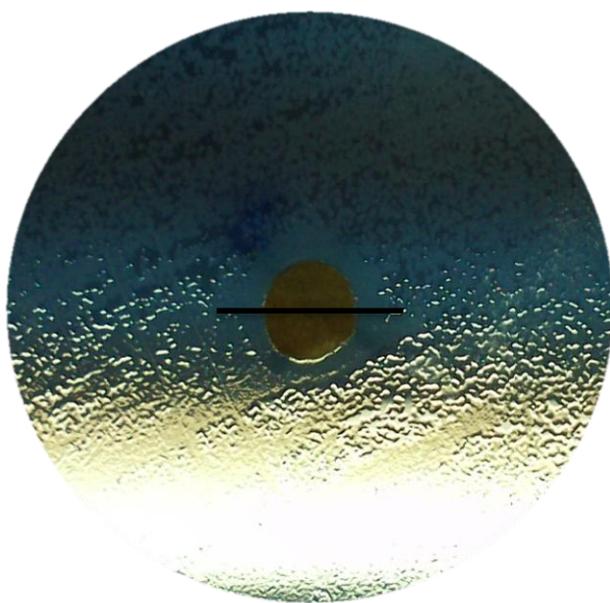


Fig. 3: Zona de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1 en agar Müller Hinton.

DISCUSIÓN

Para la obtención de nanopartículas, la selección de un solvente orgánico apropiado es esencial para su producción, debido a la técnica de precipitación del antisolvente. La selección es comúnmente guiada por la miscibilidad del solvente en agua (antisolvente) y la solubilidad de la droga (“cúrcuma”) en el solvente¹. Basado en estas consideraciones se tomó como solvente etanol químicamente puro y como antisolvente agua desionizada para producir nanopartículas de curcuminoides de 106.1 nm, mediante el método de Flash Nanoprecipitación¹², estable en el tiempo a 4°C. Lo que concuerda con Chow SF et al¹⁴, quienes lograron producir nanopartículas de un tamaño menor a 100 nm.

Dichas nanopartículas tienen un efecto antibacteriano cuando se las emplea en una concentración al 100%. No obstante, van perdiendo efecto conforme se van diluyendo, tal como se observa en la **Fig. 1** mediante la técnica de concentración mínima inhibitoria (CMI)¹⁵.

Chakraborty B et al.¹⁷ demostraron que la actividad antibacteriana de un extracto acetónico de *C. longa* tiene alta actividad antibacteriana frente al crecimiento de *P. aeruginosa*. Por su parte, Bhawana et al.¹⁶ demostraron que la curcumina puede ser soluble en agua cuando está en su forma nano. Por lo tanto, mediante ensayos antibacterianos de la suspensión de nanocurcumina demostraron que la transformación a nano mejora la solubilidad en agua y la eficacia de la curcumina como un agente antimicrobiano.

Los curcuminoides obtenidos del rizoma de *C. longa*, en su forma nano, aumenta su solubilidad en agua e incrementa su efecto in vitro como agente antimicrobiano en el crecimiento de *P. aeruginosa* CMH-1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dosler S, Karaaslan E. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. *Peptides*. 2014. doi: 10.1016/j.peptides.2014.09.021
2. Ravindran P, Nirmal K, Sivaraman K. *Turmeric the genus Curcuma*. New York: Taylor y Francis Group, 2007
3. Mostacero León J, Castillo Picón F, Mejía Coico FR, Gamarra Torres OA, Charcape Ravelo JM, Ramírez Vargas RA. *Plantas medicinales del Perú. Taxonomía, ecogeografía, fenología y etnobotánica*. Perú: Asamblea Nacional de Rectores, 2011.

4. Sidhu GS, Singh AK, Thaloor D, Banaudha KK, Patnaik GK, Srimal RC, et al. Enhancement of wound healing by curcumin in animals. *Wound Repair Regen.* 1998; 6(2): 167-177.
5. Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandsarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral and antifungal activity of curcumin. *BioMed Res Int.* 2014; 186864
6. Shankar TN, Shantha V, Ramesh HP, Murthy IA and Murthy VS. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guinea pigs & monkeys. *Indian J Exp Biol.* 1980; 18 (1): 73-75
7. Soni KB, Kuttan R. Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1992; 36(4): 273-275
8. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharmaceutics.* 2007; 4(6): 807-818
9. Sharna RA, Steward WP, Gescher AJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 595: 453-470
10. Tiyaboonchai W, Tungpradit W, Plianbangchang P. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 2007; 337 (1-2): 299-306
11. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Res Treat.* 2014; 46(1): 2-18.
12. Han J, Zhu Z, Qian H, Wohl AR, Beaman CJ, Hoyer TR, et al. A simple confined impingement jets mixer for flash nanoprecipitation. *J Pharm Sci.* 2012; 101(10): 4018-4023.
13. Johnson BK, Prud'homme RK. Chemical processing and micromixing in confined impinging jets. *AIChE J.* 2003; 49(9): 2264-2282.
14. Chow SF, Sun CC, Chow AH. Assessment of the relative performance of a confined impinging jets mixer and a multi-inlet vortex mixer for curcumin nanoparticle production. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014. doi: 10.1016/j.ejpb.2014.07.004.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically approved standard M100-S22. 7th edition Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
16. Bhawana, Basniwal RK, Buttar HS, Jain VK, Jain N. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. *J Agric Food Chem.* 2011; 59(5): 2056-2061.
17. Chakraborty B, Nath A, Saikia H, Sengupta M. Bactericidal activity of selected medicinal plants against multidrug resistant bacterial strains from clinical isolates. *Asian Pac J Trop Med.* 2014; 7(1): 435-441.

Correspondencia: Julio Arellano Barragan. Email: jarellano@unitru.edu.pe



Artículo Original

Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos y ninfas de *Oligonychus* sp. en condiciones de laboratorio

Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on adults and nymphs of *Oligonychus* sp. under laboratory conditions

Johnny Huanes-Carranza¹ y Juan Wilson-Krugg²

¹Escuela AP Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional Trujillo (UNT), Trujillo, Perú. ²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT.

RESUMEN

Se evaluó el efecto entomopatógeno de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos y ninfas de *Oligonychus* sp. en condiciones de laboratorio. Se realizó la determinación de *Oligonychus* sp. y su crianza masiva, así como la reactivación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* que fueron propagados en frascos planos con agar Sabouraud. Se realizaron 3 tratamientos con tres repeticiones cada uno; al primer tratamiento se aplicó Tween 80 al 0,1%, al segundo tratamiento se aplicó una suspensión de *B. bassiana* a la concentración de 107 con/ml y al tercer tratamiento se aplicó una suspensión de *M. anisopliae* a la concentración de 107 con/ml. Luego de la inoculación con los hongos entomopatógenos, los especímenes de *Oligonychus* sp presentaron síntomas como movimiento errático, alteración en el color del tegumento, momificación y muerte. Los ácaros muertos fueron colocados en cámara húmeda hasta la aparición de micelio, el cuál fue aislado en agar Sabouraud con antibiótico para su posterior observación microscópica y determinación que estos hongos entomopatógenos fueron los que originaron la muerte a *Oligonychus* sp. Se encontró que el menor porcentaje de supervivencia del ácaro fue frente a *M. anisopliae* con un 8,33 % a la concentración de 107 con/ml; mientras que con *B. bassiana* el porcentaje de supervivencia fue de 9,61 % a la concentración de 107 con/ml, no existiendo diferencia significativa en cuanto a la actividad entomopatógena de estos hongos. SE concluye que *B. bassiana* y *M. anisopliae* tuvo efecto entomopatógeno sobre las ninfas y adultos de *Oligonychus* sp. en condiciones de laboratorio.

Palabras clave: Control biológico, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Oligonychus*, Entomopatógenos

ABSTRACT

The entomopathogenic effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on *Oligonychus* sp. adults and nymphs under laboratory conditions was evaluated. *Oligonychus* sp. was in mass rearing, as well as, *B. bassiana* and *M. anisopliae* were reactivated and propagated in vials with Sabouraud agar, then, three treatments with three replicates each were made; the first treatment was applied Tween 80 0.1%, the second treatment a suspension of *B. bassiana* concentration of 107/mL was applied to the third treatment and a suspension of *M. anisopliae* was applied to the concentration of 107/mL. After inoculation with entomopathogenic fungi, *Oligonychus* sp specimens showed symptoms as erratic movement, altered seed coat color, death and mummification. The dead mites were placed in a moist chamber until the appearance of mycelium, which was isolated in Sabouraud agar antibiotic for further microscopic observation and determination that these entomopathogenic fungi were the originators of death *Oligonychus* sp. It was found that the lowest percentage of survival was mite against *M. anisopliae* with 8.33% at the concentration of 107/mL; *B. bassiana* whereas the survival rate was 9.61% at the concentration of 107/mL, with no significant difference in the activity of these entomopathogenic fungi. It was concluded that *B. bassiana* and *M. anisopliae* had entomopathogen effect on nymphs and adults of *Oligonychus* sp. under laboratory conditions.

Keywords: Biological control, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Oligonychus*, Entomopathogens

INTRODUCCIÓN

Entre los diversos cultivos que se producen en el Perú, La Libertad es considerada como uno de los principales exportadores de frutales, ocupando un lugar importante por su alta rentabilidad y su efecto capitalizador; no obstante, tal desarrollo se encuentra amenazado por diversas plagas que afectan su normal desarrollo, ocasionando daños que pueden ser limitantes para la producción¹. Una de las herramientas más utilizadas para el control de estas plagas, es el control químico o agroquímico, sin embargo, el uso inapropiado de agroquímicos ha ocasionado un elevado desarrollo de resistencia^{2,3,4}.

Dentro de las principales plagas, los ácaros fitófagos son identificados como uno de los problemas fitosanitarios que causan importantes disminuciones en la calidad de los frutos, destacando la familia Tetranychidae cuyos miembros se encuentra ampliamente distribuidos en zonas costeras, asociados con más de 150 especies de plantas hospederas de importancia económica^{5,6}. Uno de tales miembros es, la arañita marrón del palto⁷, *Oligonychus* sp., que se distribuyen por toda la superficie de las hojas y frutos, incluso sobre las ramas verdes tiernas; se alimenta succionando el líquido contenido en el citoplasma de las células del tejido vegetal, utilizando su aparato bucal cortador-succionador, lo que da como resultado una decoloración inicial blanquecina que posteriormente se va tornando como puntos translucidos, en forma de áreas plateadas o verde pálidas por la remoción de cloroplastos, también ocurre oxidación de las áreas atacadas tornándose bronceadas y finalmente necrosis^{7,8,9}. Severas infestaciones pueden causar la caída prematura de hojas, defoliación, muerte regresiva, disminución del vigor y rendimiento del cultivo^{8,9,10}. La plaga está asociada a hortalizas, plantas ornamentales, frutales y malezas; por ejemplo se pudo encontrar en las hojas de: pimentón, fresa, la vid, granada, frejol, manzana y algodón¹¹.

Los hongos entomopatógenos, dentro de los controladores biológicos, destacan como microorganismos empleados para el control de diversos artrópodos, pues tienen la capacidad de causar enfermedades en los insectos y ácaros de tal forma que, mediante la aplicación de ellos, se logra mantener las poblaciones de artrópodos a niveles donde no causen daño^{12,13,4,15,16}. Los hongos entomopatógenos infectan a los artrópodos directamente a través de la penetración de la cutícula y ejercen múltiples mecanismos de acción confiriéndoles una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia^{17,18}. Además, puede aplicarse en completa armonía con las diferentes técnicas usadas en esquemas de manejo integrado, ya que poseen un gran potencial como agentes controladores, pudiendo eliminar o mantener las plagas en niveles que no ocasionan daño a los cultivos¹⁹. *Metarhizium*, *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe* y *Paecilomyces* son los más usados^{20,21}.

B. bassiana presenta gran actividad entomopatógena en variados tipos de insectos correspondientes a los órdenes coleóptera, lepidóptera, díptera, heteróptera, homóptera y también contra los ácaros de la familia Tetranychidae.²⁴ Se han reportado estudios de la eficacia de este hongo contra *Tetranychus urticae*, *Panonychus ulmi*, *Hypothenemus hampei*, *Plutella xilostella*, *Bemisia argentifolii*, *Bemisia tabaci*, afidos de cereales, *Dialeurodes citri* y *Trialeurodes vaporariorum*. *Beauveria bassiana* es usado para el control de *Hypothenemus hampei* “broca del café”, *Bemisia argentifolii* “mosquita blanca” en hortalizas, larvas de *Phyllophaga* sp “gallina ciega” y *Melanoplus* sp “chapulines” en cultivos básicos^{22,23,24,25}

M. anisopliae es utilizado para el control de plagas como el chapulín y la langosta que devastan enormes extensiones de cultivos básicos como el maíz, trigo, frijol, caña de azúcar, algodón, soya, sorgo, henequén, alfalfa, frutales y pastizales en explotaciones pecuarias; también son efectivos en el control de la mosca pinta o salivazo de los pastos y la gallina ciega, coleóptero rizófago asociado al maíz y frente al control de coleópteros^{26,27}, al mismo tiempo, presentó un 79% de efectividad al ser aplicado en *Boophilus microplus*^{20,21} y, conjuntamente con *B. bassiana*, sobre huevos de *Tetranychus cinnabarinus* se encontró entre el 54 y 67% de mortalidad²⁴

Dada la importancia de *Oligonychus* sp. como plaga de los campos de cultivo de palto en La Libertad, principal productor de la palto, espárrago, alcachofa, arándano entre otros^{1,7}, se hace imprescindible buscar métodos alternativos para reducir el uso de agroquímicos debido a que estos producen toxicidad elevada, efecto residual en el ambiente, inducción a la resistencia, eliminación de controladores nativos, generando preocupación por la calidad del medio ambiente; poniéndose más énfasis en estrategias alternativas del control de plagas, presentándose así como una buena opción el uso de hongos entomopatógenos^{14,15,17}; asimismo, debido a que no se tiene registros acerca del uso de hongos

entomopatógenos para el control de *Oligonychus sp.*, el presente trabajo se plantea como objetivo conocer el efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre ninfas y adultos de *Oligonychus punicae* en condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico:

- 500 ácaros entre ninfas y adultos de *Oligonychus sp.* recolectados durante los meses de Abril-Julio 2015 de campos de cultivo del centro poblado de Conache, distrito de Laredo, Trujillo, La Libertad, Perú
- Cultivos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* proporcionados por el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

Recolección y determinación de *Oligonychus sp.*

Se recolectaron hojas de palto, *Persea americana*, infestada naturalmente con *Oligonychus sp.*, las que fueron retiradas de la planta con ayuda de tijeras, colocadas en bolsas de papel dentro de una caja de cartón y trasladadas al Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo. Para la determinación del género *Oligonychus* se realizó observaciones bajo el estereoscopio utilizando pinceles entomológicos, teniendo en cuenta la coloración de los ácaros, las setas o pelos dorsales y los tubérculos prominentes del mismo color que el tegumento^{8,9}.

Crianza de *Oligonychus sp.*

Consistió en colocar esponjas dentro de bandejas de plástico (35x25x5cm), sobre el lecho de esponjas se colocó papel toalla y sobre ellos se depositaron hojas de palto previamente lavadas y secadas, los bordes de las hojas se rodearon con papel toalla para evitar la huida de los ácaros. La esponja se mantuvo constantemente húmeda. La crianza se realizó a 22- 25°C y a 70% H.R aproximadamente.

Reactivación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

A partir de los cultivos puros de *B. bassiana* y *M. anisopliae* se hizo suspensiones con Tween 80 al 0.1 % las que se inocularon por aspersión sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*, las que se incubaron en recipientes de plástico hasta su muerte. Las larvas muertas y con síntomas correspondientes a ataque fúngico se sometieron a condiciones de cámara húmeda, que consistió en colocarlos en una lámina porta objeto ubicada dentro de una placa de Petri estéril, la cual contuvo algodón humedecido en agua destilada estéril. Las cámaras se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días hasta la aparición de micelio sobre la superficie de las larvas de *Spodoptera frugiperda* muertas. En condiciones de esterilidad se transfirió el micelio que emerge sobre los ácaros, en tubos con Agar Sabouraud y se llevó a incubación durante 7 días a temperatura ambiente, para obtener cultivos puros reactivados. Se determinó taxonómicamente a los hongos en base a las características morfológicas macroscópicas y microscópicas.

Propagación y estandarización del inóculo de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

A partir del cultivo puro de los hongos reactivados se obtuvo una suspensión en Tween 80 al 0.1 % la que fue sembrada por suspensión mediante la técnica de siembra por superficie en frascos planos conteniendo Agar Sabouraud, los que se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días. Posteriormente a partir de los cultivos obtenidos en los frascos planos se preparó una suspensión de conidias en Tween 80 al 0.1 %, la que se estandarizó con la ayuda de la cámara de Hemocitometro a una concentración de 10⁷ con/ml para ambos hongos.

Inoculación de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae*

Se aplicaron tres tratamientos con tres repeticiones cada uno, destinándose dos tratamientos para el grupo problema y uno para el grupo control. Cada uno de los tratamientos estuvieron conformados por 156 individuos entre ninfas y adultos de *Oligonychus sp.* Al primer y al segundo tratamiento se les inoculó por aspersión, suspensiones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* a las concentraciones de 10⁷ con/ml, al tercer tratamiento (control) se les aplicó una suspensión de Tween 80 al 0.1%. Todos los tratamientos se mantuvieron a 22 - 25°C y a 70% H.R aproximadamente.

Evaluación de la actividad entomopatógena de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

Después de la inoculación se evaluó diariamente durante 7 días en los grupos problemas la aparición de síntomas y/o signos de infección micótica, en comparación con el grupo control. Para determinar, si

los hongos entomopatógenos fueron los que originaron la muerte a *Oligonychus sp*; los ácaros muertos con síntomas de ataque fúngico fueron sometidos a condiciones de cámara húmeda con la finalidad de que, si el hongo estuviera colonizando el interior del ácaro, se desarrolle y cubra la superficie exocuticular con micelio. Para ello, se colocó a los ácaros muertos en una lámina porta objeto ubicada en una placa de Petri estéril que contenía algodón humedecido en agua destilada estéril. Las cámaras húmedas se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días hasta la aparición de micelio sobre la superficie de los ácaros muertos. En completa esterilidad se transfirió el micelio que emergió sobre los ácaros hacia tubos conteniendo Agar Sabouraud inclinado, los que se incubarán a temperatura ambiente durante 7 días. Luego se procedió a la confirmación del hongo basándose en las características morfológicas macroscópicas y microscópicas.

Determinación del porcentaje de supervivencia y análisis estadístico

Para la determinación del porcentaje de supervivencia de los ácaros, a los 7 días de inoculación con los hongos entomopatógenos, se obtuvo la relación de número de ácaros vivos por tratamiento / número total de ácaros por tratamiento. $S=AsAtx100$

Dónde: S = Porcentaje de supervivencia. As = Número de ácaros sobrevivientes del tratamiento.

At= Número total de ácaros del tratamiento.

Los promedios del porcentaje de supervivencia que se obtuvieron fueron analizados mediante el Análisis de Varianza (ANAVA) con un nivel de confianza del 95%, utilizando el programa estadístico informático IBM SPSS Statistics v23.0 para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos estudiados.

RESULTADOS

La Tabla 1 presenta los síntomas y/o signo que se observaron en ninfas y adultos de *Oligonychus sp* luego de la aplicación con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sin embargo estos no se observan en las ninfas y adultos de *Oligonychus sp* inoculados con Tween 80 al 0,1%. En la Tabla 2 se presentan el número de especímenes vivos y de muertos de *Oligonychus sp* luego de la aplicación con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, se observa que hubo 15 ácaros supervivientes al tratamiento con *B. bassiana* mientras que para el tratamiento con *M. anisopliae* solo hubo 13 supervivientes.

En la Fig. 1 se observa la diferencia entre un adulto control de *Oligonychus sp* y los signos manifestados por las ninfas y adultos muertos que fueron previamente inoculadas con *B. bassiana*, en la Fig. 2, la diferencia entre un adulto de *Oligonychus sp* sin inocular y los signos manifestados por las ninfas y adultos muertos que fueron previamente inoculadas con *M. anisopliae* y en la Fig. 3 se observa que el porcentaje de supervivencia de ninfas y adultos de *Oligonychus sp* frente a la concentración de 107 con/mL de *B. bassiana* fue de 9,615%, mientras que a la concentración de 107 con/mL de *M. anisopliae* fue de 8,33%, a los 5 días de evaluación.

Tabla 1. Síntomas y/o signo observados en ninfas y adultos de *Oligonychus sp*. después de la inoculación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en condiciones de laboratorio

Síntomas/signos	Tratamientos		
	Control*	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Movimiento errático	-	+	+
Alteración en el color del tegumento	-	+	+
Momificación	-	+	+
Muerte	-	+	+

*Tween 80, -= ausencia, += presencia

Tabla 2. Número de especímenes vivos y muertos de *Oligonychus* sp. luego de la aplicación con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Estado	Tratamiento		
	Control*	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Vivos	156	15	13
Muertos	0	141	143

*Tween 80 al 1%



Fig. 1. Adulto de *Oligonychus* sp. frente a *Beauveria bassiana*: Sin inocular (control –izquierda-), inoculado (centro-izquierda, nótese la coloración oscura), cubierto por el micelio (centro derecha) y parte anterior cubierta por conidias (derecha, nótese la disposición típica de conidias coloreadas con azul de lactofenol)



Fig. 2. Adulto de *Oligonychus* sp. frente a *Metarhizium anisopliae*: Sin inocular (control –izquierda-), inoculado (centro-izquierda, nótese la coloración oscura), cubierto por el micelio (centro derecha) y parte anterior cubierta por fialides (derecha, nótese la forma típica de fialides coloreadas con azul de lactofenol)

DISCUSIÓN

La aplicación de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en especímenes de los estadios de ninfa y adulto de *Oligonychus sp* trajo como consecuencia la aparición de síntomas y signos. Para que tales síntomas se presenten ocurrió previamente un proceso de patogénesis, según Van der Gest²⁸ este proceso se inicia con la adhesión de una conidia de los hongos inoculados a la cutícula de *Oligonychus sp*, siendo necesario el reconocimiento y compatibilidad (por ejemplo de enzimas y glicoproteínas) entre el conidio y las células del tegumento del ácaro, la que estuvo influida por dos acciones: una pasiva en la cual se ejercen fuerzas electroestáticas e hidrofóbicas y; otra activa en la cual se secretan mucílagos que interactúan químicamente con las lecitinas de la membrana generando un ambiente favorable para la secreción de enzimas. Estas enzimas hidrolíticas van degradando la cutícula y proporcionando a su vez nutrientes para el hongo. Luego de la adhesión, se inicia la germinación, que es dependiente de las condiciones que les pueda brindar el insecto y el ambiente para que la conidia germine^{29,30}.

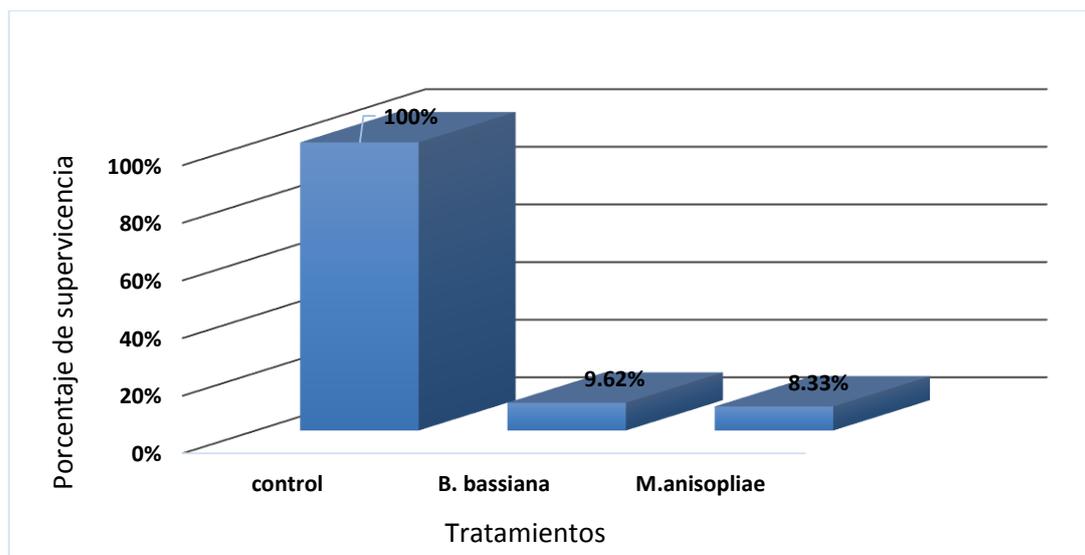


Fig. 3. Porcentaje de supervivencia de ninfas y adultos de *Olygonichus* sp., inoculados con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* a una concentración de 10^7 con/ml a los 5 días de evaluación (no hubo diferencia significativa entre la acción de hongos $-p>0,05$, pero sí entre estos y el control-).

Carvallo¹² menciona que *B. bassiana* y *M. anisopliae* requieren una humedad relativa mayor a 70% y temperatura de 20 a 25°C, siendo la temperatura durante la investigación de 20 a 22°C y la humedad relativa de 70 a 75% aproximadamente, las que favorecieron la formación del tubo germinativo iniciando la penetración en la cutícula del ácaro, involucrando este proceso a diversos mecanismos enzimáticos y procesos físicos. Las enzimas que participan en la penetración son proteasas, quitinasas y lipasas que actúan de forma secuencial, degradando la cutícula y liberando nutrientes para el hongo^{31,32}. Cazorla y Morales³³ mencionan además que estos hongos entomopatógenos al invadir a los Tetránquidos tienden a localizar sus hifas en el centro del hemocele, y producir toxinas como beauvericina, beauverolidasas, bassianolidasas e isarolidasas (*B. bassiana*) y dextruxina (*M. anisopliae*) las que actúan bloqueando el aparato digestivo, además de tener acción histolítica, afectando el sistema nervioso y muscular produciendo síntomas como lentitud en sus movimientos, sintomatología típica de un ataque por entomopatógeno observada 5 días posterior a la inoculación. Al llegar a la hemolinfa se transforman morfológicamente en blastosporas y cuerpos filamentosos de hifas que invaden el sistema inmune del hospedero multiplicándose rápidamente en los tejidos.

Prasad y Syed³⁴ mencionan que en esta etapa se activa el sistema inmune del insecto a través de los procesos de melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento; siendo la melanina la sustancia responsable del oscurecimiento del tejido, síntoma observado en la investigación. El hongo para evadir la respuesta inmune del insecto suelen prescindir de la formación de pared celular y se desarrollan como protoplastos, evadiendo su reconocimiento por los hemocitos circulantes en el hemocele³².

Luego de que los mecanismos de defensa del ácaro son sobrepasados, el hongo entomopatógeno entra en la fase de colonización agotando los nutrientes y el agua presente su interior, ocurriendo la muerte del hospedante, producto de la necrosis el cadáver se torna oscuro, se deshidrata y momifica³⁵. Luego ocurre la fase saprofitica consumiendo todo el material orgánico presente en el interior del insecto y termina en una fase de crecimiento micelial hacia el exterior. Las hifas emergen de los cadáveres de insectos a través de la boca, ano, apéndices y aberturas genitales que concluye con la producción de nuevas unidades reproductivas (conidios) sobre la superficie cubriendo el cuerpo del ácaro³⁶. Todos los síntomas y signo observados y descritos en los grupos problema no se observaron en el grupo control.

Al determinar los porcentajes de supervivencia de las ninfas y adultos de *Olygonichus* sp. en condiciones de laboratorio luego de la inoculación por los dos hongos entomopatógenos utilizados, se observa que no existen diferencias significativas en cuanto a la actividad entomopatógena de estos; es decir, que la concentración de 10^7 con/mL de *B. bassiana* y *M. anisopliae* generan el mismo efecto entomopatógeno sobre ninfas y adultos de *Olygonichus* sp..

Con respecto al porcentaje de supervivencia de ninfas y adultos de *Oligonychus* sp. ocasionada por los hongos entomopatógenos observamos que el tratamiento con *B. bassiana* presenta un mayor porcentaje de supervivencia de ácaros que el tratamiento con *M. anisopliae* no concordando con los resultados de laboratorio hallado por Orduño-Cruz et al³⁷, esto puede deberse a la variación que existe entre cepas, aun perteneciendo a la misma especie de hongo, como también a las condiciones ambientales de laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yarita Y, Cisneros F. Ciclo biológico y morfología de *Dagbertus minensis* Carv. & Fontes (Hemiptera: Miridae), en palto var. Hass, en la irrigación Chavimochic, Perú. Rev. peru. entomol. 2010; 46(1):15-19.
2. Cerna Chávez E, Landeros J, Ochoa Fuentes YM, Luna Ruiz J, Vázquez Martínez O, Ventura López O. Tolerancia del ácaro *Tetranychus urticae* a cuatro acaricidas de diferente grupo toxicológico. UAA. 2009; 44(1): 4-10.
3. Vázquez C, Ceballos MC. Efficacy of chlorfenapyr and abamectin to control of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). IDESIA. 2009; 27(1): 23-28.
4. Flores A, Silva G, Tapia M, Casals P. Susceptibilidad de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) Colectada en *Primula obconica* Hance y *Convolvulus arvensis* L. a Acaricidas. Agric. Tec. 2007; 67(2):219-224.
5. Ferragut F, Santonja M. Taxonomía y distribución de los ácaros del género *Tetranychus* Dufour 1832 (Acari: Tetranychidae), en España. Bol. San. Veg. 1989; 15(1): 271-281.
6. Gallardo A, Vázquez C, Morales J, Gallardo J. Biología y enemigos naturales de *Tetranychus urticae* en pimentón. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 2005; 74: 34-40.
7. Reyes Bello C, Mesa Cobo N. Biología de *Oligonychus yothersi* (Mcgregor) (acari: tetranychidae) sobre aguacate *Persea americana* Mill. CV. Lorena (Lauraceae). Caldasia; 2011; 33(1):211-220.
8. Baker E, Pritchard AE. Arañas rojas de América Central (Acarina: Tetranychidae). Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural. 1963; 23:309-348.
9. Quirós M, Viloria Z. *Tetranychus urticae* KOCH y *Oligonychus bagdasarjani* Baker y Pritchard, (Acari: Tetranychidae) ácaros fitófagos de importancia en vid (*Vitis vinifera* L.) en el estado Zulia.- descripción taxonómica y daños. Rev. Fac. Agron. LUZ. 1991; 8(1):1-14.
10. Cerna E, Badii MH, Ochoa Y, Aguirre LA, Landeros J. Tabla de vida de *Oligonychus punicae* Hirst (Acari: Tetranychidae) en hojas de aguacate (*Persea americana* Mill) variedad Hass, Fuerte y Criollo. U.Ciencia. 2009; 25(2):133-140.
11. Soto A, Oliveira O H, Pallini A. Integration of biological control and alternative products against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Rev UDCA Act. & Div. Cient. 2011; 14(1): 23-29.
12. Carballo M, Hidalgo E, Rodríguez A. Control Biológico de insectos mediante hongos entomopatógenos. In: Carballo M, Guharay F, eds. Control biológico de plagas agrícolas. Managua: CATIE; 2004. p. 39-57.
13. Guédez C, Castillo C, Cañizales L, Olivar R. Control biológico: Una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. ACADEMIA. 2008; 7 (13): 50-74.
14. Carballo M, Hidalgo E, Rodríguez A. Control biológico ayer, hoy y siempre. In: Carballo M, Guharay F, eds. Control biológico de plagas agrícolas. Managua: CATIE; 2004. p. 1-6.
15. Rodríguez del bosque LA, Arredondo Bernal HC. Teoría y aplicación del control biológico. México: Sociedad Mexicana de control biológico; 2007.
16. Gomez H. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos de la mosca blanca, *Bemisia tabaco* (Homóptera: Aleyrodidae) en Lima, Perú. Rev Per Entomol. 1999; 41(1):83-86.
17. Motta Delgado PA, Murcia Ordoñez B. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas, Ambi-Agua. 2011; 6 (2): 77-90. doi:10.4136/ambi-agua.187.
18. Carrillo Rayas MT, Blanco Labra A. Potencial y algunos de los mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. Acta Universitaria. 2009; 19 (2): 40-9.
19. Alburquerque Maranhao EA, Alburquerque Maranhao EH. Hongos entomopatógenos importante herramienta para el control de moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae). AAPCA. 2009; 5(1): 210-222.
20. Espinel C, Torres L, Cotes A. Efecto de hongos entomopatógenos sobre estados de desarrollo de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Rev. Colomb. Entomol. 2009; 35 (1): 18- 21.
21. Quesada Moraga E, Maranhao EA, Valverde García P, Santiago Álvarez C. Selección de *Beauveria bassiana* para el control de los aislados de la mosca blanca *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* sobre la base de su virulencia, requisitos térmicos, y la actividad toxicógeno, España. Elsevier. 2006; 36(3): 274-287.
22. Estrada ME, Romero M, Rivero MJ, Barroso F. Presencia natural de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) en Cuba. Rev Iberoam Micol, 2004; 21: 42- 43.

23. Cassol de Oliveira R; Angeli Alves LF; Oliveira Janeiro Neves PM. Susceptibilidad de *Oligonychus yothersi* (Acari: Tetranychidae) ao fungo *Beauveria bassiana*. Scientia Agricola. 2002; 59(1) :187-189
24. Bing W, Feng M. Eficacia en el campo de aplicación de *Beauveria bassiana* formulación y bajo piridaben tarifa para el control sostenible de ácaro rojo de los cítricos *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) en huertos, China. Elsevier. 2006; 39(1): 210-217.
25. Lezama R, Molina J, López M, Pescador A, Galindo E, Ángel C, et al. Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control del gusano cogollero del maíz en campo. Revaia. 2005; 9(1): 1-2.
26. Leucona RE, Díaz BM, Suceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* a los hongos entomopatógenos *Metharhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. RIA. 1998; 30(1): 25-42.
27. Van der Geest LP, Elliot SL, Breeuwer JA, Beerling EA. Disease of mites. Exp App Acarol. 2000; 24(7): 497-560.
28. Nicholls Estrada CI. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia, 2008.
29. Badii MH, Abreu JL. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. International Journal of Good Conscience. 2006; 1(1): 82-89.
30. Perdakis D, Kapaxidi E, Papadoulis G. Biological control of insect and mite pests in greenhouse solanaceous crops. European J Plant Sci & Biotechnol 2008; 2(1): 125-144.
31. Carillo-Blanco M. Potencial y algunos de los mecanismos de acción de hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. Rev Haban Cienc Méd. 2009; 19(2): 41-46.
32. Cazorla Perfetti D, Morales Moreno P. Effect of different concentrations of *Beauveria bassiana* on development and reproductive potential of *Spodoptera litura* (Fabricius). J Biopesticides. 2011; 4 (2): 161-168.
33. Prasad A, Syed N. Evaluating Prospects of Fungal Biopesticide *Beauveria Bassiana* (Balsamo) Against *Helicoverpa Armigera* (Hubner): An Ecosafe Strategy for Pesticidal Pollution. Asian J Exp Biol Sci. 2010; 1(3): 596-601.
34. Motta-Delgado PA, Murcia-Ordoñez B. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. J Appl Sci. 2011; 6 (2): 77-90.
35. Ghosh SK, Shivaprakash THM, Kharderr Khan H. Susceptibility of two spotted red spider mites, *Tetranychus urticae* (Koch) (Acarina: Tetranychidae) against entomofungal pathogens. J Biol Control. 2007; 21:183-186.
36. Orduño-Cruz N, Guzmán-Franco AW, Rodríguez-Leyva E, López-Collado J, Valdéz-Carrasco JM, Mora-Aguilera G. Susceptibility of the cactus weevil *Metamasius spinolae* to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* under laboratory and field conditions. J Appl Microbiol, 111: 939–948. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05097.x

Correspondencia: Juan Wilsn Krugg. Email: jwilson@unitru.edu.pe



Artículo Original

Efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de *Piper aduncum* sobre la supervivencia de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*

In vitro effect of hydro-alcoholic extract of *Piper aduncum* on the survival of *Trypanosoma cruzi*-tripomastigotes

Lucía Avalos¹, Guillermo Delgado¹, Jensen González¹, Carlos Luján¹ y Hermes Escalante²

¹Estudiantes de la EAP de microbiología y parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo, Perú,

²Departamento de microbiología y parasitología. UNT.

RESUMEN

Se determinó el efecto “in vitro” del extracto hidroalcohólico de las hojas de matico, *Piper aduncum*, sobre los tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* C1 obtenidos por metaciclologénesis a partir de epimastigotas. Los epimastigotes fueron cultivados en medio bifásico BHI/PYLB y la metaciclologénesis fue inducida en Grace’s Insect Medium. La susceptibilidad de los tripomastigotes frente al extracto hidroalcohólico de las hojas de matico se evaluó enfrentando el extracto disuelto en DMSO, a las concentraciones de 0.5 mg/mL, 0.96 mg/mL y 1.90 mg/mL con los tripomastigotas cultivados en medio GRACE’S. La supervivencia se midió mediante el recuento en hemocitómetro de flagelados móviles comparados con el control (sin matico). Se observó inmovilidad en las tres concentraciones empleadas en proporción directa con la concentración: a mayor concentración mayor inmovilidad.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, *Piper aduncum*, extracto hidroalcohólico; efecto tripanocida.

ABSTRACT

The effect "in vitro" of hydroalcoholic extract of leaves matico, *Piper aduncum* on the tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi* C1 obtained by metacyclogenesis from epimastigotes is determined. The Epimastigotes were grown in BHI biphasic medium/PYLB and metacyclogenesis was induced in Grace's Insect Medium. The susceptibility of tripomastigotes against the alcoholic extract of the leaves of matico was evaluated facing the extract dissolved in DMSO, at concentrations of 0.5 mg/mL, 0.96 mg/mL, and 1.90 mg/mL with tripomastigotes cultured in medium GRACE'S. Survival was measured by hemocytometer counting in mobile flagellates compared to control (without matico). Immobility was observed in the three concentrations used in direct proportion to the concentration: the higher the concentration increased immobility.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; *Piper aduncum*; hydroalcoholic extract; trypanocidal effect.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, infecta a aproximadamente 10 millones de personas en el continente americano y causa la tercera más frecuente dolencia desatendida a nivel mundial, después de la malaria y la esquistosomiasis. En el Perú, la zona costera de sur (Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna) son las zonas donde se han presentado la mayoría de casos, siendo *Triatoma infestans* el vector y *Cavia porcellus* “cobayo” reservorio.^{1,2}

Entre otras causas, la elevada frecuencia se debe a la falta de un medicamento efectivo; por ello, se ha buscado drogas alternativas, ya que no se cuenta con vacunas. Se sabe, por ejemplo, que el extracto de las hojas de *Baccharis dracunculifolia* “chilca”, *Ampelozizyphus amazonicus* “ducke”, *Nectandra falcifolia* “laurel de río”, *Helicteres gardneriana*, *Cayaponia podantha* “taiuiá”, *Mimosa arenosa* “cují”,

Paullinia elegans “ojo de muñeca”, *Rosmarinus officinalis* “romero”, *Eucalyptus globulus* “eucalipto”, *Corymbia citriodora* “eucalipto moteado”, *Cinnamomum verum* “canela”, *Myrocarpus frondosus* “incienso”, *Eugenia uniflora* “capulí”, *Citrus limón* “limón” y *Rosmarinus officinalis* “romero”; presentan actividad tripanocida⁷.

Piper aduncum “matico” (Piperaceae), planta usada en la medicina popular para el tratamiento de afecciones respiratorias, estomacales y hepáticas, presenta en sus hojas lactonas sesquiterpénicas, dehidroleucodina, helenalina, amidas, terpenos, flavonoides, neolignanos y lignanos que tendrían efectos antifúngicos, antimicrobianos, tripanocida y leishmanicida, tal como ha ocurrido con el efecto de otros extractos de plantas. En base a este antecedente se propuso la presente investigación, que estuvo orientada a determinar el efecto sobre la supervivencia de tripomastigotes de *T. cruzi* C4 del extracto hidroalcohólico de las hojas de matico, a las concentraciones de 0.5; 0.96 y 1.90 mg/mL. Se plantea que a medida que aumenta la concentración del extracto, el efecto anti-*T. cruzi* es mayor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Plantas:

Se obtuvieron en Huaranchal, Provincia de Otuzco, Departamento de La Libertad, Perú, en el 2015, a partir de plantas de *Piper aduncum* “matico”; se seleccionaron plantas jóvenes y vigorosas, se empaquetaron en bolsas de polietileno con cierre hermético y se transportaron a temperatura ambiente al Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo (Perú), para su identificación.

Parásitos:

Se utilizó una población de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, denominada C4, aislados a partir de excreciones de *Triatoma infestans* capturados en el departamento de Arequipa y mantenidos por cultivos sucesivos en medio bifásico BHI/PYLB.

Obtención del extracto hidroalcohólico de *Piper aduncum* “matico”

Después de seleccionar las hojas, se procedió a secarlas a temperatura ambiental colocándolas sobre papel Kraft por 3 días. Luego fueron llenadas en bolsas del mismo papel y se colocaron en la estufa a 40°C durante 48 horas. Fueron sacadas de la estufa y se procedió a pulverizar las hojas manualmente. Luego se tamizó hasta obtener un tamaño de partículas >1<2 mm. Se procedió a instalar el equipo Soxhlet, se colocó 4 cartuchos previamente llenados con 25g del tamizado; humedeciéndolos con alcohol de 70°C hasta su límite. Cada cartucho se extrajo durante 1 hora; obteniéndose aproximadamente 100 mL de extracto hidroalcohólico. El extracto fue puesto en estufa a 40°C por 24 horas para obtener un extracto libre de etanol, para su posteriormente realizar la liofilización.

Preparación del medio bifásico

Se extrajo 20 ml de sangre de conejo por punción cardíaca y se colocó en un matraz con perlas de vidrio agitándolo con movimientos circulares hasta ver la formación de coágulo y lograr la defibrinación de la sangre. En un matraz se agregó 10.5 g de agar BHI suplementándolo con 2 g de glucosa y se disolvió en 200 ml de agua destilada, se llevó al autoclave por 15 min a 120° C. Se dejó enfriar hasta 45 - 47°C, se agregó los 20 ml de sangre de conejo defibrinada y se mezcló hasta homogenizar. Se vertió 8 ml de medio en cada tubo 25x150mm con tapa rosca (20 tubos) y se dejó solidificar inclinando el tubo. Para el caldo PYLB, se agregó en otro matraz 0.6 g de extracto de levadura, 0.6 g de glucosa, 1.6 g de cloruro de sodio, 1.5 g de fosfato disódico y 0.08 g de cloruro de potasio. Se disolvió en 200 ml de agua destilada, se llevó a la autoclave por 15 min a 120 °C. Se dejó enfriar a 25°C, se agregó 1 ml de Penicilina G sódica 1 000 000 UI (0.5 mL/100mL) y 1 ml de Gentamicina 160mg (0.25mL/100mL). Se vertió en caldo PYLB a cada tubo 25x150mm con tapa rosca conteniendo el medio sólido.

Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*

Las formas epimastigotes de *T. cruzi* fueron cultivadas en 20 tubos de 25x150mm, estériles, con medio bifásico constituido agar BHI más 20% de sangre defibrinada de conejo (9 mL), y caldo PYLB (11 mL). La siembra se hizo a partir de dos tubos procedentes del mantenimiento de la cepa, a razón de 1 mL por tubo. El lote de cultivo fue dejado a temperatura ambiental (22 ± 4 °C) durante un máximo de 15 días, para lograr el nivel máximo de replicación de epimastigotes.

Inducción de la metacicloogénesis in vitro de *T. cruzi*

A partir del lote de epimastigotes, se extrajo los medios líquidos en tubos estériles de 13x150mm., tratando de retirar los parásitos confinados en la base del tubo, para luego centrifugarlos a 4000 rpm por

5 min. Inmediatamente después, se descartó el sobrenadante de cada tubo y los precipitados se reagruparon en un solo tubo hasta formar aprox. 2mL. Se realizó dos procesos de lavado con PBS estéril pH 7.26 conteniendo 0.5 % de Penicilina G sódica UI 1000000 / 5 mL y 0.25 % de Amikacina 500 mg /2 mL, para lo cual se agregó al tubo resultante 4 o 5 mL de PBS utilizando un gotero estéril, haciendo que la biomasa se resuspenda y entonces nuevamente se centrifugó a 4000 rpm por 5 min, con la finalidad de eliminar residuos del medio de cultivo de proliferación. Los epimastigotes lavados fueron transferidos al medio de transformación Grace's Insect Medium SIGMA®, pero previamente fueron sometidos a un lavado con el medio a experimentar. Finalmente, se acondicionó 3 tubos de 13x150mm provistos con tapones de jebe estériles, para repartir equitativamente 1 mL del volumen de pellet obtenido y añadirle seguidamente Grace's Insect Medium en proporción 1:5. Se adicionó al medio ciertos antibióticos: Penicilina G sódica 1 000 000 UI (0.5 mL/100mL) y Amikacina 500mg (0.25mL/100mL). Los tubos resultantes fueron dejados a temperatura ambiental durante 6 días. Transcurrido este periodo se realizó la verificación de la presencia de tripomastigotes y de los parásitos que se mantuvieran como epimastigote, mediante observación directa sobre lámina en microscopio.

RESULTADOS

Se encontró que el extracto hidroalcohólico de *P. aduncum* presenta efecto sobre la supervivencia de los tripomastigotes de *T. cruzi* (Tabla 1). De la población de tripomastigotes de *T. cruzi* se evidenció diferentes porcentajes de supervivencia a las concentraciones 0.5mg/mL, 0.96 mg/mL y 1.90 mg/mL del extracto de *P. aduncum*. (Tabla 2).

Tabla 1. Efecto *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Piper aduncum* en tres concentraciones diferentes: 0.5mg/mL, 0.96 mg/mL y 1.90 mg/mL, sobre poblaciones de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* C4.

CONCENTRACIÓN	EFEECTO
0.5mg/mL	Nulo
0.96 mg/mL	Poco efecto
1.90 mg/mL	Poco efecto

Tabla 2. Porcentaje de supervivencia de tripomastigotes de *T. cruzi*, tras el enfrentamiento *in vitro* con el extracto hidroalcohólico de *P. aduncum* en tres concentraciones diferentes, 0.5mg/mL, 0.96 mg/mL y 1.90 mg/mL.

SISTEMA	PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA (%) DE TRIPOMASTIGOTES DE <i>T. cruzi</i>		
	0.5mg/mL	0.96 mg/mL	1.90 mg/mL
1ª Repetición	83	48	35
2ª Repetición	80	50	30
3ª Repetición	83	30	33

DISCUSIÓN

La actividad tripanocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aducum* se encuentra relacionada con los alcaloides, flavonoides, terpenos, y lignanos por ser los componentes que se logran extraer mediante el extracto hidroalcohólico⁴.

Los flavonoides actuarían inhibiendo a nivel de la arginina cinasa, enzima clave en el metabolismo energético del parásito, así mismo, algunos tipos de flavonoides tienen como organelo blanco a la mitocondria de *T. cruzi*, del mismo modo causan daño en la estructura interna del parásito, como vacuolización y aparición de otros cuerpos residuales. Causa también cambios en la excreción de ciertos metabolitos, como acetato y succinato, posiblemente por la acción sobre ciertas enzimas o directamente sobre su síntesis, o sobre la membrana citoplasmática, causando la pérdida de su funcionamiento; los

flavonoides podrían afectar la vía glicolítica, para la obtención de energía, se sabe que *T. cruzi* consume una alta tasa de glucosa, sin embargo es incapaz de degradarla completamente en CO₂ bajo condiciones aeróbicas, excretando al medio varios productos fermentativos, que en su mayoría son acetatos, succinato y L-alanina, es acá donde los flavonoides juegan el rol de inhibir la excreción de estos metabolitos⁵.

Los alcaloides isoquinolínicos están implicados fuertemente en la inhibición de una enzima antioxidante esencial del *Trypanosoma*, la tripanotiona reductasa. Esta enzima por sí misma ejecuta una variedad de funciones y protege al parásito de varias especies reactivas de oxígeno generadas por las células de defensa del huésped. Del mismo modo, los alcaloides se ven involucrados en la inhibición de traducción proteica, alquilación del material genético, e inhibición de otras enzimas.

Los principales terpenos con actividad tripanocida son monoterpenos del grupo de los iridoides, sesquiterpenos y triterpenos. A algunos sesquiterpenos se les atribuye la actividad tripanocida, ya que se les atribuye una alta lipofiliidad y una fuerte interacción de sus grupos metileno terminales con los grupos SH de las proteínas del parásito.

Ciertos lignanos tienen una acción selectiva por la SOD del parásito, bloqueando la unión del ión metálico de la misma, inhibiendo así la acción de esta enzima.

En general, todos los compuestos alteran morfológicamente las estructuras del parásito: separación de la membrana nuclear,

Alteración de la membrana citoplasmática y desorganización de la subpelícula de los microtúbulos, la mitocondria y kinetoplasto se ven igualmente afectados. Sin embargo se sugiere, que para un mejor estudio, se aumente la concentración del extracto hidroalcohólico, puesto que a la máxima concentración, usada en la investigación, resultó tener “poco efecto”.

La actividad tripanocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aduncum* se encuentra relacionada con los alcaloides, flavonoides, terpenos, y lignanos por ser los componentes que se logran extraer mediante el extracto hidroalcohólico^{4,5}.

Se han descrito varios mecanismos por los cuales estos productos derivados de las hojas pueden ejercer su efecto anti-*Trypanosoma cruzi*.

Los flavonoides actuarían inhibiendo a nivel de la arginina cinasa, enzima clave en el metabolismo energético del parásito, así mismo, algunos tipos de flavonoides tienen como organelo blanco a la mitocondria de *T. cruzi*⁶, del mismo modo causan daño en la estructura interna del parásito, como vacuolización y aparición de otros cuerpos residuales. Causa también cambios en la excreción de ciertos metabolitos, como acetato y succinato, posiblemente por la acción sobre ciertas enzimas o directamente sobre su síntesis, o sobre la membrana citoplasmática, causando la pérdida de su funcionamiento; los flavonoides podrían afectar la vía glicolítica, para la obtención de energía, se sabe que *T. cruzi* consume una alta tasa de glucosa sin embargo es incapaz de degradarla completamente en CO₂ bajo condiciones aeróbicas, excretando al medio varios productos fermentativos, que en su mayoría son acetatos, succinato y L-alanina, es acá donde los flavonoides juegan el rol de inhibir la excreción de estos metabolitos^{3,7}.

Los alcaloides isoquinolínicos están implicados fuertemente en la inhibición de una enzima antioxidante esencial del *Trypanosoma*, la tripanotiona reductasa. Esta enzima por sí misma ejecuta una variedad de funciones y protege al parásito de varias especies reactivas de oxígeno generados por las células de defensa del huésped^{12,35}. Del mismo modo, los alcaloides se ven involucrados en la inhibición de traducción proteica, alquilación del material genético, e inhibición de otras enzimas.

Los principales terpenos con actividad tripanocida son monoterpenos del grupo de los iridoides, sesquiterpenos y triterpenos³⁰. A algunos sesquiterpenos se les atribuye la actividad tripanocida, ya que se les atribuye una alta lipofiliidad y una fuerte interacción de sus grupos metileno terminales con los grupos SH de las proteínas del parásito.

Ciertos lignanos tienen una acción selectiva por la SOD del parásito, bloqueando la unión del ión metálico de la misma, inhibiendo así la acción de esta enzima³⁷.

En general, todos los compuestos alteran morfológicamente las estructuras del parásito: separación de la membrana nuclear, alteración de la membrana citoplasmática y desorganización de la subpelícula de los microtúbulos, la mitocondria y kinetoplasto se ven igualmente afectados³⁷. En conclusión, se comprobó, que *P. aduncum* tiene propiedad tripanocida. Se sugiere que para un mejor estudio se aumente la concentración del extracto hidroalcohólico, puesto que a la máxima concentración, usada en la investigación, dio como resultado un “poco efecto”.

A medida que se aumenta la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aduncum*, entre 0.5 y 1.9 mg/mL, aumenta el efecto tripanocida “in vitro” sobre los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nuns MPC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am CollegeCardiol* 2013; 62(9):767-776
2. Becerril MA. Parasitología médica. 3ra ed. México: McGraw Hill; 2001.
3. ShimaLuize P, ShiojiTiuman T, Morello LG, Korehiza Maza P, Ueda-Nakamura T, DiasFilho BP, et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2005; 41 (1):85-94.
4. Da Silva Filho AA, De Sousa JPB, Soares S, Furtado NAJC, Andrade e Silva ML, Cunha WR, et al. Antimicrobial Activity of the Extract and Isolated Compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Naturforsch.* 2008; 63 : 40-46.
5. Rosas LV, Cordeiro MSC, Campos FR, Nascimento SKR, Januário AH, França SC, et al. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(5):663-670.
6. Truiti MCT, Ferreira ICP, Zamuner MLM, Nakamura CV, Serragiotto MH, Souza MC. Antiprotozoal and molluscicidal activities of five Brazilian plants. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38: 1873-1878.
7. Mishina YV, Krishna S, Haynes RK, Meade JC. Artemisinins Inhibit *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma bruceirhodesiense* In Vitro Growth. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(5):1852-1854.
8. Rojas J, Palacios O, Ronceros S. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla britton* (CEDRÓN) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2012; 29 (1): 61-68
9. Acevedo D, Navarro M, Monroy L. Composición Química del Aceite Esencial de Hojas de Orégano (*Origanum vulgare*). *Inf. Tecnol.* 2013; 24 (4): 43-47.
10. Ferreira ME, Cebrián-Torrejón G, Corrales AS, Vera de Bilbao N, Rolón M, Gomez CV, et al. *Zanthoxylum chiloperone* leaves extract: first sustainable Chagas disease treatment. *J Ethnopharmacol.* 2011; 133(3):986-93.
11. Azeredo CMO, Santos TG, Lameiro de Noronha Sales Maia BH, Soares MJ. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. *BMC COMPLEM ALTERN M.* 2014, 14:309.
12. Rojas J, Solís H, Palacios O. Evaluación *in vitro* de la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. *AnFacmed.* 2010; 71(3):161-165.
13. Muñoz Ortiz V, Duchén Uriarte EP, Wagner F, Ferreira ME, Serna E, Torrez S, et al. Actividad tripanocida in vitro e in vivo de extractos etanólicos de algunas plantas medicinales bolivianas. *BIOFARBO.* 2010; 18(1): 69-75.
14. Tenorio Vergara JL, Hernández Carvajal JE, Adolfo Vallejo G, Dairo Ramos J. Actividad tripanocida en el *Trypanosoma cruzi* del extracto etanólico de las semillas de la *Xylopia aromatica*. *Rev Cubana Farm,* 2006. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152006000300008&script=sci_arttext
15. Cano E, Cano Ortiz A, Martínez Lombardo MC, Alatorre Cobos J. flora medicinal utilizada en las enfermedades de la piel y en belleza. *Boletín. Instituto de EstudiosGiennenses.* 2009; 200:165-179
16. Gualtieri M, Villalta C, Guillén AM, Lappena E, Andara E. Determinación de la actividad Antimicrobiana de los Extractos de la *Azadirachta indica* A. Juss (Neem). *INHRR* (versión online) 2004 enero [acceso 18 de octubre de 2014]; 35(1). Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-04772004000100003&script=sci_arttext
17. Mann A, Ifarajimi OR, Adewoye AT, Ukam C, Udeme EE, Okorie II, et al. In vivo antitrypanosomal effects of some ethnomedicinal plants from nupeland of north central Nigeria. *J Tradit Complement Altern Med.* 2011; 8(1):15-21.
18. Atías A. Parasitología médica. 1ra ed. Chile: Mediterraneo; 1998.
19. Zaidenberg A, Tournier HA, Schinella GR, Buschiazzi HO. *Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 2000; 42:21-26.
20. Ziccardi M, Lourenço-de-Oliveira R, Nogueira R. The Haemoculture of *Trypanosoma minasense* Chagas, 1908. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996; 91 (4):501-505.
21. López Eyzarguirre N, D 'Jesús R. Infectividad en ratón de las formas de *Trypanosoma cruzi* diferenciadas por primocultivo en medio LIT. *Revista Med-ULA.* 1999; 5 (1-4): 44-47.
22. Durán C, Quiroga MF, Díaz-Bello Z, Silva S, Roschman-González A, Strauss M, tertejo F. *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi*: Conducta trófica en cultivos axénicos puros y mixtos. *Bol. Mal. Salud Amb.* 2009; XLIX (1): 97-106.

23. Saldaña C, Córdova O, Vargas F. Utilización de *Lepidium peruvianum*, Maca, como medio de cultivo para el crecimiento de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Perú. med. exp. salud pública. 2006; 23(2):137-140.
24. Gomes Pereira F, Dias dos Santos PR, Guimarães EF, Villela Romanos MT, Coelho Kaplan MA, De Lima Moreira D. Antiviral activity of the crude n-hexane extract from leaves of *Piper lepturum* var. *angustifolium* (C.DC.) Yunck. (Piperaceae). J. MedPlants Res. 2013; 7(42): 3076-3080.
25. Sharapin N. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma X Química Fina Farmacéutica. Colombia: Pinzón R, editor; 2000.
26. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega S.A.; 2002.
27. Duque Beltran S, Caceres Vega E, Corredor Arjona A. Comportamiento de flagelados de la familia Trypanosomatidae en dos medios de cultivo modificados. RevBiomed.1988; 8(1,2)
28. Acosta N, López E, Ferreira ME, Vera de Bilbao N. Determinación de la sensibilidad in vitro de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* al benzimidazol y al extracto de hoja de la planta *Zanthoxylum chiloperone*. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2013; 9(2): 16-25.
29. Muñoz Ortiz V, Mollinedo P, Garcia P. Actividad tripanocida y antioxidante in vitro de los extractos etanólicos de *Caesalpinia pluviosa* DC. y *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. BIOFARBO. 2011; 19(2): 1-5.
30. Muñoz Ortiz V, Duchén Uriarte EP, Wagner F, Ferreira ME, Serna E, Torrez S, y col. Actividad tripanocida in vitro e in vivo de extractos etanólicos de algunas plantas medicinales bolivianas. BIOFARBO. 2010; 18(1): 69-75.
31. Escalante H, Jara AJ, Mayhuay R. Antígenos de excreción-secreción de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* detectados por Western Blot usando sueros de pacientes con parasitosis confirmada. REBIOL 2013; 33(2): 67-75.
32. Reiche E, Cabazzana M, Okamura E. Evaluation of the Western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas disease: Hospital Estatal de Londina, Brazil. Am J Trop Med Hyg 1998; 59(5): 750-756.
33. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976; 72(1): 248-254
34. Aurazo C, Roldán J y Jara CA. *Trypanosoma cruzi*: características del crecimiento y susceptibilidad a violeta de genciana “in vitro” de dos poblaciones nativas de Zaña, Lambayeque, Perú. REBIOL 2013; 34(1): 69-75.
35. Jimenez V, Brengio S, Giordano O, Tonn C, Sanchez M, Burgos M, et al. The trypanocidal effect of sesquiterpene lactones helenalin and mexicanin on cultured epimastigotes. J Parasitol. 2005; 91(1):170-4.

Correspondencia: Hermes Escalante Añorga. Email: hescalante@unitru.edu.pe
--



Artículo Original

Efecto del aceite esencial de los frutos y semillas de *Pimpinella anisum* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*

Effect of essential oil of fruits and seeds of *Pimpinella anisum* on the growth of *Staphylococcus aureus*

Olenka Leytón¹, Jaquelin Saavedra¹, Katerin Segura¹, Leticia Solorzano¹ y
Orlando Pretell²

¹Escuela A.P de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo (UNT), Trujillo-Perú.

²Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal. UNT

RESUMEN

Se evaluó el efecto antibacteriano del aceite esencial de los frutos y semillas de *Pimpinella anisum* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Para la obtención del aceite esencial se utilizó el método de destilación por arrastre con vapor de agua y para la evaluación del efecto sobre el crecimiento de la bacteria se utilizó el método de dilución en caldo: 0.05 mL, 0.08 mL, 0.2 mL, 0.5 mL y 0.8 mL del aceite esencial de ambas estructuras vegetales. Se encontró que el aceite esencial, tanto del fruto como de la semilla, en los volúmenes de 0.5 mL y 0.8 mL inhibió el crecimiento de *S. aureus*.

Palabras clave: aceite esencial, antibacteriano, método de dilución en caldo, destilación por arrastre de vapor de agua, *Pimpinella anisum*, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

The antibacterial effect of essential oil of fruit and seeds of *Pimpinella anisum* on growth of *Staphylococcus aureus* was evaluated. To obtain the essential oil was used the method of distillation carryover with steam and for the evaluation of the effect on the growth of the bacterium was used the method of dilution in broth: 0.05 mL, 0.08 mL, 0.2 mL, 0.5 mL and 0.8 mL of essential oil of both structures vegetables. It was found that the essential oil, both the fruit and the seed, in the volumes of 0.5 mL and 0.8 mL inhibited the growth of *S. aureus*.

Key words: antibacterial, essential oil, method for broth dilution, distillation by entrainment of water vapour, *Pimpinella anisum*, *Staphylococcus aureus*

INTRODUCCIÓN

La naturaleza ha sido fuente de agentes medicinales por cientos de años y un impresionante número de drogas modernas han sido aisladas de estas fuentes¹. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) más del 80% de la población hace uso de la medicina tradicional para atender a sus necesidades primarias de salud^{2,3}. Entre tanto, la resistencia de los microbios patógenos a las drogas y los efectos colaterales de las medicinas sintéticas ha conducido a focalizarse en remedios naturales y la fuente de éstos, algunas especies vegetales, han sido registradas como antibacterianos; sin embargo pocas han sido sujetas de rigurosa validación^{1,3}.

Sanícula, *Eryngium*, *Pimpinella*, *Oreomyrrhis*, *Daucus*, *Conium*, *Totilis*, *Azorrella*, *Lilaeopsis*, *Foeniculum* y *Pastinaca* son géneros de la familia Apiaceae que presentan interés médico debido a que

cotienen en su estructura terpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos, a los que se les atribuyen propiedades antibacterianas, antivirales, antitumorales, antiinflamatorias y antioxidantes^{3,4}.

Dentro de la familia Apiaceae, *Cuminum cyminum*, *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgare*, *Pimpinella anisum* y *Petroselinum crispum* han sido sometidas a investigaciones que han permitido determinar que sus aceites esenciales y extractos presentan actividad antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae*³, *Campylobacter jejuni*⁴, *Mycobacterium tuberculosis*⁵, *Xanthomonas campestris*⁶ y *Pseudomonas aeruginosa*⁷.

P. anisum es una hierba anual originaria del Cercano Oriente, ampliamente cultivada en la cuenca del Mediterráneo, se ha utilizado como una hierba aromática y especias desde tiempos egipcios y antigüedad además ha sido cultivada en toda Europa^{9,10}. El aceite esencial de los frutos contiene de 80 a 95% de trans-anetol como el principal compuesto, seguido de éter metil chavicol (estragol), anisaldehído y cis-anetol¹¹, estos componentes en estudios anteriores se ha determinado que tienen efecto antibacteriano.

La adquisición de enfermedades por el consumo de los alimentos contaminados con microorganismos como *Staphylococcus aureus* ha hecho que actualmente se utilicen muchas técnicas para el control e inhibición de microorganismos con el fin de preservar los alimentos. Se conocen pocas investigaciones en las que se utiliza a *P. anisum* como antibacteriano, por ello, en la presente investigación se busca conocer si esta especie tiene algún efecto in vitro sobre el crecimiento de *S. aureus*, utilizando el aceite esencial de los frutos y semillas a los volúmenes de: 0.05 mL, 0.08 mL, 0.2 mL, 0.5 mL y 0.8 mL; se plantea que a mayor volumen del aceite esencial de los frutos y semillas de *P. anisum*, habrá mayor inhibición del crecimiento de *S. aureus* in vitro. Entonces, podría utilizarse para reemplazar aditivos o conservantes alimentarios sintéticos logrando productos inocuos con un menor impacto sobre el medio ambiente y en la salud.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico:

- Frutos y semillas frescas e íntegras de *P. anisum* procedentes de la ciudad de Huaraz (Perú) e identificadas en el Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo (Perú)
- Aceite esencial de frutos y semillas de *P. anisum* obtenidos mediante el método de destilación por arrastre de vapor de agua^{11,12}.
- Cultivo puro a partir de la cepa de *S. aureus* ATCC-25923 coagulasa positivo donada por el Hospital Regional Docente de Trujillo (Perú).

Preparación y estandarización del inóculo bacteriano^{12,13,14}

El inóculo bacteriano se llevó a una concentración igual a la del estándar 0,5 de McFarland, que equivale a 1.5x10⁸ células/ml, la suspensión se preparó de acuerdo al tiempo de su fase logarítmica.

Evaluación del efecto del aceite esencial^{12,14}

Para evaluar la actividad antimicrobiana se empleó el método de dilución en caldo⁽¹²⁾. Se utilizó 7 tubos con caldo nutritivo, tres tubos para el control: un tubo sólo con caldo nutritivo más el inóculo bacteriano y el otro tubo con caldo nutritivo y dimetilsulfoxido⁽¹³⁾ (DMSO) más en inóculo bacteriano; los otros tubos contienen volúmenes de 0.05 mL, 0.08 mL, 0.2 mL, 0.5 mL y 0.8 mL del aceite esencial de los frutos y semillas de *P. anisum*, los cuales serán añadidos con una pipeta, dichos volúmenes serán enfrentados al inóculo de *S. aureus* estandarizado al igual que los tubos control. Se trabajó por duplicado. Se incubó a 37°C por 24 horas los 8 tubos; pasado este tiempo, de cada tubo se extrajo 0.1 mL y se hizo una siembra por superficie en una placa con agar nutritivo y se procedió al recuento de UFC/mL.

RESULTADOS

Al enfrentarse el aceite esencial de *P. anisum* con *S. aureus* se obtuvo que con los volúmenes de 0.5 mL y 0.8 mL no presentaron crecimiento de *S. aureus* mientras que a los volúmenes 0.05 mL, 0.08 mL y 0.2 mL hubo crecimiento inversamente proporcional con el volumen del aceite. (Tabla 1)

Tabla 1. Recuento de UFC de *Staphylococcus aureus* al enfrentarlo a diferentes volúmenes del aceite esencial de los frutos y semillas de *Pimpinella anisum*

ENSAYO	UFC/ml
Control positivo	45x10 ⁶
0.05 mL	24x10 ⁵
0.08 mL	15x10 ⁵
0.2 mL	4x10 ⁵
0.5 mL	0
0.8 mL	0

Existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

DISCUSIÓN

La familia Apiaceae se caracteriza por tener propiedades antimicrobianas^{3,14,17}. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, se basa en el deterioro de varios sistemas enzimáticos. Los resultados de la evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de *P. anisum* frente a *S. aureus* (Tabla 1) presenta una relación directamente proporcional, es decir, que a mayor volumen de aceite, mayor es la inhibición del crecimiento. Esto se debe a que dentro de los principales componentes del aceite esencial se encuentra el trans-anetol^{15,18,19,20}, que en estudios anteriores presentó actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*⁽¹⁶⁾; el éter metil chavicol (estragol), el cual es un compuesto que ataca a la membrana citoplasmática del microorganismo destruyendo la capacidad selectiva y permitiendo el escape de componentes intracelulares^{17,20}; y otros componentes en menor cantidad como el anisaldehído y el cis- anetol, entre otros^{18,19,20}.

El estudio realizado muestra que la actividad antimicrobiana se debe a la acción combinada de los compuestos químicos sobre distintos orgánulos de las células, esto es debido a la variedad de dichos compuestos presentes en el aceite esencial de la planta estudiada

AGRADECIMIENTOS

Al MgC Orlando Pretel Sevillano, del laboratorio de Termorregulación y Endocrinología, por el análisis y revisión crítica de la primera y segunda versión del manuscrito y aprobación de su versión final; a la profesora Patricia Torres Plasencia por su apoyo en la parte experimental de la investigación y al MgC Juan Wilson Krugg por su apoyo en la obtención del cultivo puro de *Staphylococcus aureus*.

Conflictos de interés: los autores declaran no tener conflictos de interés en la publicación de este artículo.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Yasmin H, Kaisar A, Sarker MR, Rahman MS, Rashid MA. Preliminary anti-bacterial activity of some indigenous plants of Bangladesh. Dhaka Univ J Pharm Sci. 2009; 8(1): 61-65
2. Bakkali F, Averbeck S, Averveck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-A review. Food & Chem Toxicol 2008; 46:446-475
3. Fabri RL, Nogueira MS, Dutra LB, Bouzada MLM, Scio E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de especies da familia Asteracea. Rev Bras Ol Med Botucaten 2011; 13(2): 183-189
4. Mostacero J, Mejía F, Gamarra O. Taxonomía de las Fanerogamas útiles Del Perú. Perú. Editorial Normas Legales S.A.C. 2002

5. Jaramillo B, Duarte E, Martelo I. Composición Química Volatil del Aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. Colombiano y Determinación de su Actividad antioxidante. Rev Cubana Plant Med. 2011; 16(2): 140-150
6. Derakhshan S, Sattari M, Bigdeli M. Effect of Cumin (*Cuminum cyminum*) seed essential oil on biofilm formation and plasmid Integrity of *Klebsiella pneumoniae*. Rev. Pharmacogn Mag. 2010. 6 (21): 57-61
7. Khan D, Hassan F, Ullah H, Karim S, Baseer A et al. Antibacterial activity of Phyllanthus emblica, *Coriandrum sativum*, *Culinaris medic*, *Lawsonia alba* and *Cucumis sativus*. Acta Pol Pharm. 2013; 70(5):855-859.
8. Pino Oriela, Sánchez Yaíma, Rojas M. Miriam, Abreu Yudith, Correa M. Teresa. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. Rev. Protección Veg. 2012. 27 (3): 181-187
9. Esquivel P, Favela J, Garza E, Waksman N, Ríos M, Camacho M. Antimycobacterial Activity of Constituents from *Foeniculum vulgare* var. Dulce Grown in Mexico. Molecules. 2012; 17(7): 8471-8482.
10. Petrolini FV, Lucarini R, de Souza MG, Pires RH, Cunha WR and col. Evaluación del potencial antibacteriana de *Petroselinum crispum* y *Rosmarinus officinalis* contra las bacterias que causan infecciones de las vías urinarias. Braz JMicrobiol.2013; 44(3):829-834.doi: 10.1590/S15173822013005000061.
11. Armijo J, Vicuña E, Romero y Otiniano P, Condorhuamàn, Hilario B. Modelamiento y Simulación del Proceso de Extracción de Aceites Esenciales mediante la Destilación por Arrastre con Vapor. Rev. Per. Quím. Ing. Quím.2012; 15 (2) :19-27
12. Noorizadeh H, Farmany A, Noorizadeh M. Application of GA-PLS and GA-KPLS calculations for the prediction of the retention indices of essential oils. Quim Nova. 2011; 34(8):1398-1404.
13. Kosalec I, Pepeljnjak S and Kustrak D. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). Acta Pharm. 55(2005) 377-385.
14. Ramírez S, Castaño D. Metodologías para Evaluar la Actividad Antibacteriana de Compuestos de Origen Vegetal. Scientia et Technica. 2009; 42: 263 – 268.
15. Bahram M, Ghajar and Shirley A. Harmon. The Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Permeability of *Staphylococcus aureus*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1968; 32 (6): 940-944
16. Pavela R, Sajfrtová M, Sovová H, Bárnet M. The insecticidal activity of *Satureja hortensis* L. extracts obtained by supercritical fluid extraction and traditional extraction techniques. Appl Entomol Zool. 2008; 43(3):377-382.
17. Shojail A, Abdoll M. Review of Pharmacological Properties and Chemical Constituents of *Pimpinella anisum*. ISRN Pharmaceutics.2012. doi:10.5402/2012/510795
18. Mukhopadhyay R, Miró M, Anerjee AB. Actividad antimicrobiana de *Illicium verum* Hook. f. Ars Pharmaceutica.2001. 42:3-4; 209-220.
19. Nychas, GJE. Natural antimicrobials from plants. En new methods of food preservation. Gould G W. (Ed). Chapman y Hall.London.UK.Chap.4:59-89
20. Alkuraishy HM. Evaluation the Antibacterial Activity Of Aniseed: In Vitro Study. WebmedCentral: Journal of Clinical research and healthcare management 2012; 3(6).

Correspondencia: Orlando Pretel Sevillano. Email: opretej@unitru.edu.pe
--

Guía para los autores

La revista **REBIOL** es el órgano oficial de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo que publica investigaciones en los diversos campos de las Ciencias Biológicas y afines. Se admiten investigaciones científicas y tecnológicas que no estén publicados parcial ni totalmente o en estado de revisión en otro medio de publicación. La recepción de los informes es permanente y la prioridad de su publicación se hará de acuerdo al orden en el que fueron aceptados y aprobados. La publicación se realizará luego de ser sometido a un arbitraje anónimo por personas versadas.

Naturaleza de los informes.

Se acepta para publicaciones sólo aquellos informes de las categorías siguientes: **a) trabajos originales**, que son informes completos, orientados al registro de hechos o fenómenos y al desarrollo de conceptos (generalizaciones, leyes o teorías; **b) notas científicas**, que son artículos cortos, sobre asuntos muy específicos, que aportan al conocimiento, pero no necesariamente al desarrollo de conceptos, cuyos resultados son difícilmente verificables, debido a que son hechos o fenómenos muy esporádicos o la muestra es muy difícil de encontrar (también puede prepararse de esta manera sobre nuevos métodos, técnicas y aparatos y redactados de modo que no es posible su repetición por razones de propiedad industrial y otros; y **c) revisiones o monografías**, que son informes críticos en los que se reúnen, analizan y discuten informaciones ya publicadas y relativas a un solo tema.

Preparación del manuscrito

Los manuscritos deben ser redactados de modo impersonal, en una extensión máxima de 20 páginas para los trabajos originales, 10 para las notas científicas y 35 para las revisiones bibliográficas. Deben ser escritos a doble espacio, con márgenes de 3 cm a cada lado.

Se recomienda evitar errores gramaticales y de puntuación en el texto y seguir las normas internacionales relacionadas con la escritura de los nombres científicos, de números, de símbolos o abreviaturas de prefijos de pesos y medidas, matemáticos, estadísticos y químicos. Además, no se debe escribir palabras completamente con mayúscula, salvo para siglas y en las figuras.

Estructuración del manuscrito.

Los trabajos originales y las notas científicas deben estructurarse en este orden: **título** (en español e inglés, de una extensión aproximada a no mayor de las 20 palabras, sin abreviaturas, fórmulas químicas ni autores de taxa científicos), **autor(es)** y **dirección(es)**, **resumen y abstract** (en un solo párrafo y extensión aproximada a las 200 palabras), **introducción**, **material y métodos**, **resultados**, **discusión**, **reconocimientos** (opcional y sólo a personas que han contribuido significativamente a la investigación), **referencias bibliográficas**), **tabla(s) y/o figura(s)** (opcional) y leyendas de figuras. Con las mismas características, las revisiones, por su lado, deben estructurarse en este orden: **título**, **autor(es)** y **dirección(es)**, **tabla de contenidos**, **introducción**, **tópicos de revisión**, **reconocimientos** (opcional), **referencias bibliográficas**, **tablas y figuras** (opcional) y leyendas de figuras.

Las referencias y las citas bibliográficas deberán estructurarse acogiéndose a uno de los sistemas internacionales, de preferencia el de **Vancouver**. Las tablas sólo deben tener tres líneas horizontales y ninguna vertical, un título claro y entendible por sí mismo, sin necesidad de recurrir al texto y precedido de un número arábigo.

Descripción de los procedimientos para el manejo de los manuscritos

Los autores enviarán sus manuscritos al Editor (cjara@unitru.edu.pe) conjuntamente con una carta declarativa.

El Editor verifica si el material enviado se ajusta a la línea editorial de la revista. Si es conforme, el artículo es sometido a un sistema de arbitraje de pares (**peer review**), recurriendo a mínimo dos (02) revisores o evaluadores externos, para que en el plazo máximo de quince días expresen sus opiniones (según la “**Hoja de Opinión**”), recomendando la aceptación o rechazo del artículo. Si el artículo no se ajusta a la línea editorial, el Editor se reserva el derecho de enviar un informe al autor para cambiar o rehacer su artículo, total o parcialmente, teniendo los autores que iniciar nuevamente el proceso de envío de su trabajo. En el peor de los casos, el manuscrito se rechaza y es comunicado a los autores, adjuntando un informe con las razones de la denegación. Los nombres de los revisores se mantienen en el anonimato para el(los) autor(es) durante todo el proceso. **Aunque, para facilitar el arbitraje, los autores pueden enviar una lista de cuatro (4) posibles revisores, especialistas en el tema del artículo, con sus respectivas direcciones de correo electrónico.**

Hoja de Opinión

Los revisores responden a las siguientes preguntas:

1. ¿El manuscrito representa una contribución nueva y original?
2. ¿El resumen es adecuado?
3. ¿Las palabras clave son las adecuadas?
4. ¿El material enviado especifica claramente el propósito del trabajo?
5. ¿El método, estrategia, intervención o experimento es idóneo, aplicable y replicable?
6. ¿Los resultados son válidos para otros contextos y realidades?
7. ¿Se logra el objetivo declarado?
8. ¿Se cita bibliografía adecuada y actualizada para el desarrollo del tema?
9. ¿Considera que las conclusiones están acordes con la información que se presenta?
10. ¿El material debe ser revisado en términos de estilo, ortografía y gramática?
11. ¿Cómo calificaría este manuscrito?

Sobresaliente __; Muy bueno __; Bueno __; Regular __; Deficiente __.

12. ¿El artículo es aceptable para su publicación?

SI, en su forma actual.

SI, con algunas modificaciones

SI, después de una revisión importante

NO, debe ser rechazado.

Tras el regreso de las opiniones, éstas se envían al autor para que tenga en cuenta las sugerencias y/o comentarios de los revisores y vuelva a presentar el manuscrito. Se repite el procedimiento hasta que no haya observaciones.

Nota

Mientras el manuscrito se esté evaluando para su publicación, no podrá ser enviado a otras revistas. Una vez aprobado para publicación, todos los derechos de reproducción total o parcial pasarán a la revista REBIOL.

Envíos

Los manuscritos deberán ser preparados en Word para Windows (formato electrónico y digital) y enviados a:

REBIOL
Av. Juan Pablo II s/n - Ciudad Universitaria
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional de Trujillo
Trujillo, Perú
Email: cesarj75@hotmail.com