

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE ACEITES ESENCIALES DE
EUCALIPTO (*eucalyptus*), CASCARA DE LIMÓN (*citrus limón*) Y MANDARINA (*citrus
reticulata*) EN DOS TIPOS DE BACTERIAS PATOGENAS**

MAGALY ELIZABETH TOBAR DELGADO

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO**

2016

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE ACEITES ESENCIALES DE
EUCALIPTO (*eucalyptus*), CASCARA DE LIMÓN (*citrus limón*) Y MANDARINA (*citrus
reticulata*) EN DOS TIPOS DE BACTERIAS PATOGENAS**

MAGALY ELIZABETH TOBAR DELGADO

Trabajo de grado bajo la modalidad de diplomado presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agroindustrial

Asesor:

Esp M.Sc FRANCISCO EMILIO ARGOTE VEGA

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PASTO**

2016

NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas en este Trabajo de Grado son Responsabilidad de los autores.

Artículo 1 del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Concejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Esp M.Sc Francisco Emilio Argote Vega

Asesor

M.Sc. Zully Ximena Suárez Montenegro

Jurado

Ph.D. Andrés Mauricio Hurtado Benavides

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre de 2016

RESUMEN

En el desarrollo de estas nuevas investigaciones, muchos subproductos de la industria alimentaria son una fuente potencial de componentes bioactivos con propiedades antimicrobianas que resultan ser de gran interés para la industria (Aruma et.,al 2012). De acuerdo a esto la posibilidad de aprovechar los subproductos generados en las empresas alimentarias como una opción que contrarreste el uso de productos químicos en los alimentos ofrece una alternativa diferente de conservación de alimentos y así mismo contribuye a mejorar la problemática medioambiental.

ABSTRACT

In the development of these new investigations, many by-products of the food industry are a potential source of bioactive components with antimicrobial properties that are of great interest to the industry (Aruma et al., 2012). Accordingly, the possibility of taking advantage of by-products generated in food companies as an option that counteracts the use of chemicals in food offers a different alternative of food preservation and also contributes to improve environmental issues.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	12
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
2. JUSTIFICACION.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. ESTADO DEL ARTE.....	19
5. MARCO TEORICO	22
5.1 Bacterias patogenas en alimentos.	22
5.1.1 Escherichia coli:.....	22
5.1.2 Staphylococcus aureus:.....	23
5.2 Aceites esenciales.	24
5.2.1 Métodos de obtención.	24
5.2.1.1 Destilación por arrastre de vapor:	24
5.2.2 Extracción con disolventes.	25
5.2.3 Extracción por fluidos supercríticos	26
5.2.4 Extracción por microondas.	27
5.3 Emulsiones.	27
5.3.1 Fenómenos involucrados en la desestabilización de una molécula.	28
5.3.2 Sedimentación.....	28
5.3.3 Floculación.....	28

5.3.4 Coalescencia.	28
5.4 Tensoactivos.	29
5.5 Mínima Concentración inhibitoria	29
5.5.1 Dilución en agar.	29
5.5.2 Método de microdilución.	30
5.5.3 Método de difusión en disco.	30
6. METODOLOGIA	32
6.1 Parámetros de formulación de la emulsión.	32
6.2 Microorganismos y condiciones de crecimiento	36
6.3 Evaluación de las pruebas de inhibición mediante el método de microdilución en caldo colorimétrico en caja de elisa	36
6.4 Prueba confirmatoria.	38
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
7.1 Formación de la emulsión.....	40
7.2 Inhibición bacteriana	43
7.3 Prueba confirmatoria	48
8. CONCLUSIONES	49
9. RECOMENDACIONES	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE TABLAS**Pág.**

Tabla 1.	Rango de valores calculados para la cantidad de aceite esencial en la emulsión (<i>Staphylococcus aureus</i>).....	33
Tabla 2.	Rango de valores calculados para la cantidad de aceite esencial en la emulsión (<i>Escherichia coli</i>).....	34
Tabla 3.	Concentraciones de los aceites esenciales ($\mu\text{L}/\text{mL}$) para <i>Staphylococcus aureus</i> . ..	34
Tabla 4.	Concentraciones de los aceites esenciales ($\mu\text{L}/\text{mL}$) para <i>Escherichia coli</i>	35
Tabla 5.	Cantidades en μL de cada componente de la emulsión para <i>Staphylococcus aureus</i> . 41	
Tabla 6.	Cantidades en μL de cada componente de la emulsión para <i>Escherichia coli</i>	42
Tabla 7.	Mínima concentración inhibitoria de aceites esenciales de eucalipto, cascara de limón y mandarina	44

LISTA DE FOTOGRAFÍAS**Pág.**

Fotografía 1.	Escherichia coli y Staphylococcus aureus.....	36
Fotografía 2.	Diámetro medio y distribución de la molécula en la emulsión evaluada a 40X en 24 y 48 horas.....	43
Fotografía 3.	Resultados prueba de susceptibilidad bacteriana-caja de Elisa.....	44

LISTA DE DIAGRAMAS

	Pág.
Diagrama 1. Parámetros de formulación de la emulsion.	38
Diagrama 2. Microorganismos y condiciones de crecimiento	39
Diagrama 3. Mínima concentración inhbitoria mediante microilucion en caja de Elisa	39

INTRODUCCION

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se pueden definir como el síndrome originado por la ingesta de alimentos, incluida el agua, que contienen agentes etiológicos en cantidades tales que afectan la salud del consumidor a nivel individual o en grupos de población; de acuerdo a lo anterior es importante considerar la presencia de microorganismos de carácter patógeno que son los responsables de dichas enfermedades y la aparición de graves intoxicaciones alimentarias.

El Ministerio de Salud reporta algunos microorganismos asociados a las ETA tales como *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* entre otros, que se encuentran principalmente en alimentos contaminados o que no han pasado por un proceso adecuado de producción o conservación.

Estos casos han tenido relevancia por la industrialización de la producción alimentaria, la elaboración de alimentos de consumo inmediato, prácticas higiénicas inadecuadas y la distribución masiva del comercio alimentario. Como medida principal de prevención se hace necesario mantener vigilancia sanitaria pero también es importante conocer que los hábitos de consumo alimenticio han pasado por grandes cambios en muchos países creando nuevas necesidades de consumo y perfeccionando las técnicas convencionales de conservación de alimentos.

Los métodos de conservación de alimentos que estén exentos de productos químicos pero que contengan compuestos antimicrobianos seguros y eficaces abren paso a numerosos estudios con productos naturales como es el caso de los aceites esenciales de plantas ya que los conservantes químicos aunque son usados como control microbiano, generan gran debate por los efectos secundarios sobre la salud humana. En este contexto en los últimos años los aceites esenciales

naturales se han convertido en un tema de investigación en beneficio de la industria alimentaria puesto que el deterioro de los alimentos causada por microorganismos durante el procesamiento y almacenamiento podría ser manejado con este tipo de procedimientos por aportar agentes antimicrobianos. (Prakash et al., 2015).

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos aromáticos que se obtienen por medio de diferentes métodos de extracción a partir de material vegetal (flores, tallos, raíces, hojas, frutos, y semillas), algunos de estos y otros extractos de plantas poseen características antibacterianas y antifúngicas que han sido evaluadas como una fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos, como alternativas para la preservación de alimentos y para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Solorzano et al., 2011). De la misma manera los subproductos generados en las empresas tipo alimentarias de frutas y verduras generan una gran cantidad de residuos orgánicos que trae consigo considerables pérdidas económicas y medioambientales, sin embargo tienen un amplio potencial de aprovechamiento que debe ser empleado de manera eficiente, dentro de ello la extracción de aceites esenciales como estrategia que permita reducir y limitar la presencia de patógenos en alimentos. (Viuda et., al 2008).

Por lo tanto, en este estudio se evaluó la capacidad inhibitoria de tres aceites esenciales de eucalipto, cáscara de limón y mandarina en bacterias ATCC *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus* a través del método de micro dilución en caldo colorimétrico. Este trabajo servirá de insumo para futuras investigaciones relacionadas con la prevención de ETA, la inocuidad y la salud pública.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los productos alimenticios están frecuentemente propensos a la contaminación causada por agentes patógenos algunos de ellos generados durante el almacenamiento, el transporte o el procesamiento después de la cosecha lo que trae consigo pérdidas significativas en la calidad, cantidad, composición de nutrientes, y finalmente se reduce su valor en el mercado, según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación los casos registrados de pérdidas de alimentos en mal estado en los que se incluye cereales, granos, nueces, frutas, verduras carnes y especias se reportan en cifras equivalentes a toneladas métricas de alimentos cada año; para Colombia la pérdida y desperdicio de alimentos equivale a 9.76 millones de toneladas al año de los cuales 6.2 millones se pierde y 3.54 millones de toneladas se desperdician (DNP 2016).

Gran cantidad de bacterias patógenas se encuentra ampliamente distribuidas en la naturaleza en reservorios acuáticos y animales los cuales son una importante fuente de reserva de patógenos, entre estos, *Escherichia coli* ha sido identificado como el principal agente etiológico responsable de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (Musa et al., 2008). Estas bacterias están asociadas a enfermedades gastrointestinales producto del consumo de alimentos contaminados tanto en origen como en proceso por falta de higiene e inadecuadas prácticas de procesamiento y conservación. Las infecciones vienen acompañadas de fiebre e inflamación intestinal con diarrea acuosa y en ocasiones con sangre, además de las manifestaciones después de la infección, se han presentado lesiones cutáneas, infecciones de las vías respiratorias inclusive neumonía e infección del tracto urinario. (Park, 2008)

La Organización Mundial de la Salud afirma que las enfermedades transmitidas por el agua y los alimentos presentan un problema creciente y generalizado de salud pública, se estima que afecta a 1 de cada 3 personas al año en todo el mundo, y dar lugar a 2,2 millones de muertes

afectando mayoritariamente a la población infantil y desencadenando así el problema de salud pública más extendido mundialmente; en Colombia para el año 2015 según datos del Instituto Nacional de Salud se reportaron 795 brotes de ETA y 32 brotes en el departamento de Nariño.

A pesar de conocer y utilizar los métodos de conservación de los alimentos y las prácticas de almacenamiento, la contaminación y el deterioro de los mismos sigue siendo un problema importante a la hora de evaluar la inocuidad alimentaria ya que se conoce que el empleo de diferentes productos químicos han contribuido de manera significativa como conservantes en el control de los alimentos, pero así mismo la mayoría de estos presentan efectos secundarios en la salud humana (Angiolillo et., al 2013). De esta manera el consumo de alimentos que han sido conservados mediante métodos químicos ha generado de alguna manera cierta inconformidad por parte de los consumidores y las industrias alimentarias los cuales actualmente tienen tendencias de consumo más saludables que contribuyen a mejorar su calidad de vida y por lo tanto los alimentos frescos, mínimamente procesados o conservados sin aditivos químicos han creado una necesidad de gran importancia dentro del mercado.

De acuerdo con lo anterior el presente estudio plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿es viable la inhibición de las bacterias *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus* a partir de aceites esenciales de eucalipto, cáscara de limón y mandarina?

2. JUSTIFICACION

Con el fin de garantizar la seguridad alimentaria, existe la necesidad de contar con medidas de control eficaces como conservantes antimicrobianos que generen inocuidad en los alimentos y que de la misma manera no traigan efectos secundarios debido a su consumo. En la actualidad se evidencia una demanda importante de alimentos que no contienen productos químicos artificiales perjudiciales, y en cuanto a la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos ha crecido el interés de investigación relacionado con la búsqueda de alternativas a los antibióticos como son los antimicrobianos naturales para extender la vida útil y el deterioro de los alimentos a causa de agentes patógenos. (Varona et., al 2013)

En el desarrollo de estas nuevas investigaciones, muchos subproductos de la industria alimentaria son una fuente potencial de componentes bioactivos con propiedades antimicrobianas que resultan ser de gran interés para la industria (Aruma et.,al 2012). De acuerdo a esto la posibilidad de aprovechar los subproductos generados en las empresas alimentarias como una opción que contrarreste el uso de productos químicos en los alimentos ofrece una alternativa diferente de conservación de alimentos y así mismo contribuye a mejorar la problemática medioambiental.

De esta manera los productos de origen natural como los aceites esenciales han sido estudiados como inhibidores potenciales de crecimiento bacteriano en la conservación de los alimentos demostrando eficacia bactericida, antioxidante y antifúngica, (Varona et., al 2013). Por lo tanto es evidente que en cuanto a seguridad alimentaria hoy en día se hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias que permitan eliminar o reducir la presencia de patógenos en los alimentos y para esto se plantea la posibilidad de utilizar aceites esenciales de plantas y subproductos de la industria alimentaria como una opción de conservación de alimentos.

El desarrollo de la presente investigación permitirá generar un aporte científico importante a las próximas investigaciones que se realicen en cuanto a la inhibición bacteriana con aceites esenciales con una alta pertinencia en salud pública.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad inhibitoria de aceites esenciales de Eucalipto (*eucalyptus*), cáscara de limón (*citrus limón*) y mandarina (*citrus reticulata*) en dos tipos de bacterias patógenas.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar los parámetros de la emulsión para cada uno de los aceites esenciales.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales en las cepas bacterianas de *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus* mediante el método de microdilución en caldo colorimétrico.

4. ESTADO DEL ARTE

Los aceites esenciales son compuestos volátiles naturales presentes en las plantas, hierbas, especias que cumplen un amplio espectro de actividades tales como bactericidas, virucida, fungicida y medicinal, muchos de estos han sido ampliamente estudiados demostrando tener efecto antimicrobiano contra los patógenos transmitidos por los alimentos. (Gyawali e Ibrahim, 2014; Prakash et al., 2015; Brenes y Roura, 2010).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende de su composición química en donde los frutos cítricos tienen aproximadamente 400 compuestos cuyo contenido depende de los métodos específicos de cultivo, extracción y separación (Nannapaneni et al., 2010). Dado que los aceites esenciales de cítricos se encuentran principalmente en la cáscara de la fruta, su extracción es económicamente sostenible, porque la cáscara constituye una pérdida para la industria de jugos de frutas; en consecuencia el interés de estos como agentes antimicrobianos y conservantes en los alimentos abre una posible alternativa para sustituir los conservantes y antibióticos convencionales utilizados para extender la vida útil de los productos alimentarios y eliminar la carga patógena.

Algunas de las aplicaciones en cuanto a inhibición microbiana a partir de aceites esenciales han demostrado eficacia frente a varios patógenos comunes en la industria alimentaria dentro de los cuales se encuentran *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Enterococcus fecalis*, *Vibrio parahemolyticus* y otros (Callaway et al., 2011).

Los aceites de frutos cítricos han sido evaluados como posibles alternativas a los antimicrobianos basados en productos químicos, es importante dar a conocer que las propiedades antimicrobianas de los aceites cítricos se han estudiado relativamente hace poco mostrando alto interés debido a que su principal componente es el limoneno el cual ejerce un amplio espectro en cuanto a la actividad antimicrobiana y ha demostrado ser eficaz frente a *S. aureus*, *L.*

monocytogenes, *S. enterica* y *Saccharomyces bayanus*, (Chikhouné et al., 2013 y Settanni et al., 2012).

Moreira et al., 2009. Estudiaron la mínima concentración inhibitoria para aceites de frutos cítricos que como principales componentes se encuentran el limoneno y linalol frente a bacterias patógena donde demostraron eficacia contra cepas de *E.coli* en caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) a 37 ° C. El linalol es otro componente de aceites cítricos que presenta propiedades antimicrobianas, fue evaluado frente a cepas de *Shigella sonnei* y *Salmonella flexneri* demostrando eficacia bactericida.

La mínima concentración inhibitoria se define como la concentración más baja de un compuesto activo que inhibe el crecimiento visible de los organismos de prueba; Se determinó la mínima concentración inhibitoria mediante el método de dilución en medio líquido con aceites esenciales de cítricos como naranja (*Citrus sinensis*), limón (*limón Citrus*) y mandarina (*Citrus reticulata*), los cuales fueron estudiados para examinar su actividad antimicrobiana frente microorganismos patógenos, a través de espectrometría de masa y cromatografía de gases se pudo identificar 65 compuestos como principales constituyentes volátiles, el limoneno era el componente principal en los tres aceites esenciales y los resultados obtenidos mediante la técnica de la mínima concentración inhibitoria evidenciaron que el aceite esencial de mandarina era el mejor inhibidor del crecimiento de microorganismos Gram-negativos con valores de MCI:10-30 µL/mL; los aceites esenciales de limón y naranja mostraron actividad antimicrobiana significativa frente a las células bacterianas Gram-positivas; sin embargo su uso en combinación con tratamientos térmicos podría dar como resultado productos más seguros y con mejores propiedades. (Espina et al., 2011).

Por otra parte el aceite esencial de eucalipto tiene como principal componente el terpeno 1,8-cineol, también conocido como eucaliptol, la cantidad de este compuesto depende de la especie

específica y se sabe que poseen actividad antimicrobiana significativa (Goldbeck et al., 2014). El aceite esencial de eucalipto es uno de los aceites esenciales de mayor comercialización en el mundo y debido a esto existe un creciente interés en su aplicación como un aditivo natural para alimentos, medicamentos y cosméticos, tanto en la investigación científica y la industria. (Goldbeck et al., 2014 y Ishnava et al., 2013).

Se estudió la actividad antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto para diferentes cepas bacterianas dentro de las que se encuentra *E. coli* entre otras; los resultados de las concentraciones de inhibición varían de 4 hasta 30 $\mu\text{L/mL}$, lo cual indica que este aceite podría ser explotado como antibiótico natural. (Angelo et. al., 2015)

De la misma manera Bachir y Benali, (2012) examinaron la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de las hojas de Eucalipto frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, los resultados obtenidos mostraron que este aceite esencial tiene actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram negativas (*E. coli*), así como bacterias Gram positivas (*S. aureus*).

5. MARCO TEORICO

5.1 Bacterias patógenas en alimentos.

Las enfermedades transmitidas por alimentos se originan por consumir alimentos contaminados con toxinas microbianas o con una o varias bacterias patógenas. Esta contaminación usualmente se presenta por la incorrecta manipulación de los alimentos en el medio que está en contacto directo con ellos, sin embargo las enfermedades entéricas no solo se adquieren de esta manera, sino que la gravedad del problema se pone en evidencia al considerar que los agentes patógenos potenciales se encuentran en diversos ambientes, incluyendo la presión osmótica elevada y la humedad reducida, lo que explica por qué pueden sobrevivir y desarrollarse en las secreciones nasales del portador. Además, la contaminación del alimento puede ser endógena o de lo contrario el alimento se contaminó en algún punto de su transformación (Mercado et., al 2012).

5.1.1 *Escherichia coli*:

Escherichia coli es una bacteria Gram-negativa, en forma de bacilo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae que se encuentra en una gran variedad de ecosistemas incluido el tracto gastrointestinal del ser humano y de los animales de sangre caliente, es uno de los patógenos mayormente asociados a los brotes por intoxicación alimentaria, su importancia como problema de salud pública se hizo patente en 1982, después de un brote registrado en los Estados Unidos. Este microorganismo es capaz de actuar como bacteria oportunista causando una gran variedad trastornos infecciosos como, infecciones del tracto urinario, meningitis, infecciones de heridas entre otras, además, puede actuar también como patógeno primario en el tracto intestinal. Se habla de diversos tipos de *E. coli* causantes de enteritis y de brotes epidémicos, la bacteria se transmite al hombre usualmente por el consumo de alimentos que estén contaminados tales como

productos de carne cruda o poco cocida, leche cruda, hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas.(OMS, 2011)

Esta bacteria puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C. Algunos tipos de *E. coli* pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta a un pH de 4,4, y en alimentos con una actividad de agua mínima de 0,95. Se destruye cociendo los alimentos hasta que todas las partes alcancen una temperatura de 70 °C o más. *E. coli* es un patógeno de importancia por su impacto en la salud pública implicado frecuentemente en brotes y casos esporádicos. (Mercado et., al 2012).

5.1.2 *Staphylococcus aureus*:

Staphylococcus aureus es una bacteria anaerobia Gram positiva, considerada como un importante patógeno transmitido por los alimentos debido a la capacidad que poseen para producir enterotoxinas estafilocócicas.

La intoxicación alimentaria estafilocócica se caracteriza por un inicio repentino de los síntomas, con vómitos, dolor abdominal y calambres en el estómago siendo este el más común (Murray, 2005).Típicamente, una intoxicación alimentaria estafilocócica se produce después de la ingestión de alimentos que están contaminados con *S. aureus* por un manejo inadecuado y el posterior almacenamiento a temperaturas no óptimas. La intoxicación causada por esta bacteria es una de las principales causas de brotes transmitidos por alimentos pero la incidencia real del microorganismo es probablemente subestimada debido a entre otras razones los brotes menores no reportados, muestras que se recogen incorrectamente y los exámenes de laboratorio que usualmente no van más allá de los exámenes de rutina sin llegar a confirmar el patógeno causante de la enfermedad (Argudin et al., 2010).

Los alimentos que favorecen el crecimiento de esta bacteria, son por ejemplo, los de origen animal con alto contenido en proteínas, como leche, productos lácteos, carne, productos cárnicos

y ensaladas, productos de panadería, en particular los pasteles rellenos de crema y pasteles que han sido con frecuencia con asociados a los brotes de *S. aureus* (Hennekinne y col ., 2012).

5.2 Aceites esenciales.

Los aceites esenciales son componentes de plantas compuestos por una mezcla de terpenos, terpenoides, aldehídos y alcoholes a los que se atribuye su actividad antimicrobiana. En la actualidad existen muchos estudios tomando como insumo los aceites esenciales debido a se plantea la posible alternativa de una sustitución a los conservantes y antimicrobianos químicos. (Espina et al., 2011).

Los aceites esenciales con efectos antimicrobianos han sido numerosas veces estudiados y reportados por lo cual se ha encontrado que pueden variar en algunas de sus propiedades tales como la densidad, viscosidad, rendimiento y sobre todo, en su composición química debido a que esto depende en gran parte de del tipo de material vegetal del cual se extraiga así como también diversos lugares, formas y condiciones de cultivo.

5.2.1 Métodos de obtención.

Los aceites esenciales se obtienen mediante métodos como prensado, extracción con solventes, extracción por medio de dióxido de carbono líquido en condiciones supercríticas donde se han demostrado buenos rendimientos. El método de mayor uso es destilación por arrastre con vapor y también es importante nombrar la extracción asistida por microondas. En el método de extracción con solventes no tiene mayor pertinencia en cuanto al tema de inhibición bacteriana debido a que se ha encontrado que los aceites esenciales extraídos con hexano resultan tener mayor eficacia antimicrobiana. (Burt, 2004).

5.2.1.1 Destilación por arrastre de vapor:

En la destilación por arrastre de vapor de agua se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente volátil de una sustancia por medio de la acción directa del vapor de agua en la

mezcla al cual se lo denomina vapor de arrastre, su función además de arrastrar el componente volátil es la de condensarse para formar otra parte inmiscible que cederá su calor latente a la mezcla que se va a destilar para lograr su evaporación. Durante la extracción se tendrá la presencia de dos fases inmiscibles que son la orgánica y la acuosa donde cada uno ejerce su propia presión de vapor y corresponde a la del líquido puro a una temperatura de referencia. La destilación por arrastre de vapor es un método sencillo y de bajo costo pero necesita de largos periodos de tiempo y general mente tiene bajos rendimientos en comparación con otros métodos. (Guan et al., 2011).

Cuando se usa vapor saturado, pero la materia prima está en contacto con el agua se denomina hidrodestilación y se describe de la siguiente manera: el estado de la materia prima puede ser molido, cortado, entero o la combinación de éstos. El vapor de agua se puede generar a través de un hervidor, caldera o base del recipiente, la materia prima se calienta y se va liberando el aceite esencial contenido y éste, a su vez debido a su alta volatilidad se va evaporando. Al ser soluble en el vapor circundante, es arrastrado y la mezcla, vapor saturado y aceite esencial fluye hacia un condensador mediante un cuello de cisne o prolongación curvada del conducto de salida. En el condensador, la mezcla es condensada y enfriada, hasta la temperatura ambiente. A la salida del condensador, se obtiene una emulsión líquida inestable, esta es separada mediante decantación, el aceite esencial se va acumulando debido a su casi inmiscibilidad en el agua y a la diferencia de densidad y viscosidad con el agua. El proceso termina, cuando después de varias decantaciones el volumen del aceite esencial acumulado en el no varía con el tiempo. (Palomino y Cerpa, 2000)

5.2.2 Extracción con disolventes.

En este método la muestra se seca y es molida para ponerla en contacto con disolventes orgánicos como alcohol, generalmente este procedimiento se realiza a escala de laboratorio ya que nivel industrial no genera tanta rentabilidad.

Los disolventes utilizados para la extracción tienen diferentes tipos de restricciones en cuanto a los residuos máximos que puedan dejarse cuando los aceites esenciales son la materia prima principal. Las muestras obtenidas mediante este método usualmente son de color más oscuros debido a que arrastran algunos pigmentos más sin embargo se recuperan muchos compuestos de tipo aromático. En el proceso de extracción el disolvente con el aceite esencial se filtra y se evapora a presión atmosférica y/o al vacío.

En este tipo de procedimientos se obtienen masas viscosas dependiendo de la materia prima dentro de esto, los métodos más utilizados a nivel de laboratorios son extracción por flujo y mediante equipo Soxhlet o extracción alcohólica. (Chua et al., 2009).

5.2.3 Extracción por fluidos supercríticos

La extracción por fluidos supercríticos es una operación unitaria que explota el poder disolvente de fluidos supercríticos en condiciones encima de su temperatura y presión crítica. Es posible obtener extractos libres de disolventes utilizando fluidos supercríticos y la extracción es más rápida que con la utilización de disolventes orgánicos convencionales. Estas ventajas son debidas a la alta volatilidad de los fluidos supercríticos (gases en condiciones ambientales normales) y las propiedades de transporte mejoradas (alta difusividad y baja viscosidad). Particularmente usando dióxido de carbono el tratamiento es a temperatura moderada y es posible lograr una alta selectividad de microcomponentes valiosos en productos naturales. La extracción de compuestos fenólicos y pigmentos se ve favorecida con el uso de codisolventes como el etanol junto al CO₂ (Vatai et al., 2009). Entre las ventajas de la extracción por fluidos supercríticos se encuentran entre otras, que los tiempos de extracción se reducen, se obtienen mayores rendimientos, es posible seleccionar sustancias y la composición de los extractos cambiando los parámetros de extracción, se requiere de menos energía.

5.2.4 Extracción por microondas.

El uso de microondas es otra alternativa de extracción de aceites esenciales. Esta técnica puede utilizarse asistiendo un método convencional como la hidrodestilación o adaptando un equipo para establecerlo como método independiente, como la extracción por microondas sin disolvente, en esta técnica no se necesita agregar ningún disolvente o agua si se emplea material fresco, los equipos para llevar a cabo esta técnica se pueden adaptar modificando un horno de microondas convencional, haciendo un orificio en la parte superior que conecte el matraz de fondo plano con una aparato de refrigeración. La extracción por microondas tiene beneficios como una reducción considerable del tiempo y del consumo de energía. (Bousbia et al., 2011).

5.3 Emulsiones.

La definición de una emulsión se refiere a una dispersión coloidal de gotas de un líquido en otra fase líquida. Estos sistemas de dispersión están constituidos por dos líquidos inmiscibles en los que la fase dispersa se encuentra en pequeñas gotas distribuidas en la fase continua o dispersante.

Por lo general las emulsiones son sustancias cuyas moléculas contienen una parte no polar y otra polar, por lo que es posible que se disuelvan tanto en agua como en disolventes orgánicos y aceites. Dependiendo del dominio de una de las partes de la molécula sobre la otra, el emulgente tendrá un carácter lipofílico o lipofóbico y por consiguiente, presentará una mayor afinidad por el agua o por los aceites. (McClements, 200).

Varios sistemas coloidales se pueden utilizar para incorporar compuestos hidrófobos en sistemas acuosos donde se incluyen las emulsiones las cuales son termodinámicamente estables y generalmente las mezclas isotrópicas de agua, aceite y los tensoactivos se utilizan para mejorar la carga de fase dispersa. Las emulsiones se han estudiado para disolver compuestos hidrófobos en sistemas de carácter alimentario, la industria farmacéutica, cosmética y las aplicaciones de

recuperación de petróleo (Rao y McClements, 2011) de donde estudios recientes han demostrado la potencial aplicación de emulsiones formadas con aceites esenciales como conservantes antimicrobianos para mejorar la seguridad microbiológica, la calidad de los productos frescos y como antioxidantes para mejorar la alimentación (Wang et al., 2014)

5.3.1 Fenómenos involucrados en la desestabilización de una molécula.

Cuando ocurre la colisión entre gotas de una emulsión, pueden ocurrir varios comportamientos dependiendo de las propiedades de los componentes de la emulsión. (Danielsson y Lindman, 1981).

5.3.2 Sedimentación.

Se produce cuando parte de la emulsión se separa en sentido descendente por la acción de la gravedad formando una fase líquida en la parte inferior, en este fenómeno las gotas más grandes se mueven a mayor velocidad hacia la superficie si la densidad de la fase dispersa es menor que la de la continua. En los casos extremos, las gotas se concentran en la superficie, las gotas no pierden su individualidad y el proceso es reversible.

5.3.3 Floculación.

Es la adhesión de las gotas sin fusionarse, no existe una variación en la distribución de tamaño de gotas, es un proceso de agregación de gotas sin que éstas cambien el diámetro promedio de las mismas.

5.3.4 Coalescencia.

Este proceso implica la unión de varias gotas para formar otras más grandes, lo que finalmente conduce a la separación de las fases. Para que se produzca la coalescencia, es necesario que la película interfacial que rodea las gotas, así como el surfactante sufra un completo deterioro.

5.4 Tensoactivos.

Este tipo de sustancias poseen una doble afinidad polar- apolar; la parte polar tiene afinidad por los solventes polares en particular el agua y se denomina comúnmente parte hidrófila o hidrofílica, el grupo apolar se llama parte hidrófoba, hidrofóbica o lipofílica, este tipo de moléculas muestran una fuerte tendencia a migrar a las interfaces, de tal forma que su grupo polar se encuentra dentro del agua y su grupo apolar se encuentra orientado hacia un solvente orgánico. La acción del emulgente o tensoactivo es disminuir la tensión superficial hasta que empiecen a formarse agregados moleculares “micelas”. (Moulik y Paul 1998).

5.5 Mínima Concentración inhibitoria

La mínima concentración inhibitoria hace referencia a la concentración más baja a la que se inhibe el crecimiento bacteriano, de esta manera cuando se determina la mínima concentración inhibitoria de un aceite esencial esta puede estar en cualquier lugar entre la concentración más baja y la siguiente en la que se observe crecimiento. Es importante tener en cuenta que las diferencias en los valores de la mínima concentración inhibitoria en estudios contra el mismo organismo podría ser debido a diferencias en la composición de aceite, que plantean las diferencias regionales de temperatura, de humedad o crecimiento de la fruta cuando se extrajeron los aceites y el diferente método de extracción (Fisher y Phillips, 2006).

Las concentraciones mínimas inhibitorias de aceites esenciales pueden ser evaluadas mediante algunos mecanismos como el método de dilución en agar, dilución en caldo o difusión en disco. (Burt, 2004).

5.5.1 Dilución en agar.

En estos métodos se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio con agar. El antimicrobiano se añade cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de

antimicrobiano. El número de placas de cada concentración a preparar vendrá dado por el número de microorganismos que se vaya a estudiar. (Lorian, 2005)

5.5.2 Método de microdilución.

En el método de microdilución se utiliza una placa de microtitulación con pocillos de fondo en “U”. Teniendo en cuenta que la mayoría de placas disponibles tienen 96 pocillos (12x8), por lo que permite hacer ensayos con cada uno de ellos, y para el mismo microorganismo 8 antimicrobianos y 11 diluciones, la última columna se suele utilizar como control de crecimiento o viceversa. En ocasiones se preparan placas con 12 diluciones de antimicrobiano y se utiliza una placa adicional para realizar los controles. El volumen final de cada pocillo es habitualmente de 100-150 μL , por lo que antes de la inoculación de la placa, cada pocillo debe contener 100 μL de caldo con antimicrobiano (volumen de inóculo menor de 10 μL). Se empieza a llenar las placas con solución más baja de antimicrobiano en la columna 11 después de los controles, posteriormente se añade el volumen del caldo en las columnas 2 a 11. (Rodríguez et al., 2000)

5.5.3 Método de difusión en disco.

Consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria obtenida por métodos de dilución, sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la concentración mínima inhibitoria (Rodríguez et al., 2000)

Este proceso implica la unión de varias gotas para formar otras más grandes, lo que finalmente conduce a la separación de las fases. Para que se produzca la coalescencia, es necesario que la película interfacial que rodea las gotas, así como el surfactante sufra un completo deterioro.

6. METODOLOGIA

6.1 Parámetros de formulación de la emulsion.

Las emulsiones se formaron a partir de tres tipos de aceites esenciales: Eucalipto (*eucalyptus*), cáscara de limón (*citrus limón*) y mandarina (*citrus reticulata*) los cuales fueron proporcionados por el grupo de investigación TEA de la Universidad de Nariño, se hicieron diferentes extracciones mediante el método de hidrodestilación trabajados en la planta piloto de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial.

Para la preparación de las emulsiones se realizó una mezcla del aceite esencial el cual es de carácter lipofílico y por lo tanto es la parte dispersa de la emulsión más el medio de cultivo bacteriano líquido de infusión cerebro y corazón (BHI) apto para el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, este es de carácter hidrofílico y constituye la fase continua de la emulsión; como surfactante se utilizó Tween 20.

En la formulación de la emulsión se mantuvo constantes las variables de operación las cuales fueron la temperatura, velocidad y tiempo de agitación. Se realizaron ensayos por triplicado con una unidad muestral de 3 ml de emulsión, en donde se varió la proporción del Aceite respecto al Tween 20 así: 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:3. La emulsión resultante se observó al microscopio a un objetivo de 40x y 100 x.

La mezcla de aceite/agua se obtuvo homogenizando los componentes de la emulsión por medio de agitación mecánica en Vortex (Type: V-1 plus, Alemania) a máxima velocidad durante cinco minutos, posteriormente las muestras se llevaron a calentamiento en baño María a 60°C por tres minutos, finalmente se mezclaron en vortex a la misma velocidad durante cinco minutos y se dejó reposar.

Para determinar la variación de las concentraciones de aceite esencial se realizó un intervalo de datos con límites inferior y superior de acuerdo a las concentraciones en mg/ml

correspondientes al antibiótico que contrarresta la resistencia de la bacteria al mismo; para *Staphylococcus aureus* se utilizó oxacilina 5 mg/mL y para *Escherichia coli* ampicilina 2 a 8 mg/mL. (CLSI, 2012); de la misma manera también se tuvo en cuenta la densidad de los aceites esenciales la cual fue de 0,95 g/mL para cada uno de estos.

A continuación se muestra el rango de valores calculados en los cuales se varía la cantidad de aceite esencial en la emulsión.

Tabla 1.

Rango de valores calculados para la cantidad de aceite esencial en la emulsión (*Staphylococcus aureus*).

Concentración de aceite (µL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	8,4	10,2	12,0	13,8	15,6	17,4	19,2	21,0	22,8	26,4

Fuente. Este estudio

Tabla 2.

Rango de valores calculados para la cantidad de aceite esencial en la emulsión (*Escherichia coli*).

Concentración de aceite (µL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	6,3	11,0	15,7	20,4	25,2	29,9	34,6	39,3	44,0	48,8

Fuente. Este estudio

Con estos valores se calculó las concentraciones en µL/mL del aceite esencial y se realizaron emulsiones de un volumen total igual a 3 mL variando las cantidades de Tween 20 en la relación que resultó tener mayor estabilidad y menor cantidad de surfactante.

Tabla 3.

Concentraciones de los aceites esenciales (µL/mL) para *Staphylococcus aureus*.

Concentración de aceite (µL/mL)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
	2,8	3,4	4,0	4,6	5,2	5,8	6,4	7,0	7,6	8,8

Fuente. Este estudio

Tabla 4.**Concentraciones de los aceites esenciales ($\mu\text{L/mL}$) para *Escherichia coli*.**

Concentración de aceite ($\mu\text{L/mL}$)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
	2,1	3,6	5,2	6,8	8,4	9,9	11,5	13,1	14,6	16,2

Fuente. Este estudio

Se verificó la estabilidad de la emulsión mediante un seguimiento fotográfico a través del microscopio con el fin de evidenciar si esta se ve desestabilizada por defectos tales como la sedimentación, coalescencia y la floculación lo que resulta en alteraciones de la distribución del tamaño de partícula y posible separación de fases durante el almacenamiento (McClements, 2012).

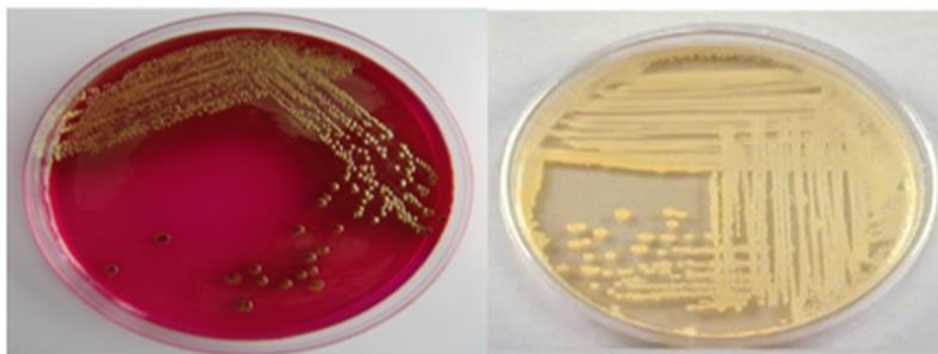
Las emulsiones preparadas se almacenaron a temperatura ambiente. Su aspecto se examinó durante 48 horas evaluando principalmente:

- Apariencia de la emulsión: emulsiones que presenten una ligera capa cremosa en la superficie debido a la presencia del aceite esencial.
- Presencia de algunas gotitas de aceite en la superficie de las emulsiones, lo que indica el principio de coalescencia.
- Anillo de aceite en la superficie de las emulsiones.
- A través del microscopio se determinó el diámetro promedio de la molécula.

6.2 Microorganismos y condiciones de crecimiento

La capacidad de inhibición bacteriana de los aceites esenciales de Eucalipto, cascara de limón y mandarina se evaluó frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) las cuales fueron proporcionadas por el Instituto Departamental de Salud de Nariño y se mantuvieron almacenadas a temperatura de refrigeración previamente a su activación.

Para la activación bacteriana se realizaron inóculos en tubos de ensayo adicionando 10 µL de cada bacteria en 10 mL del medio de cultivo líquido de infusión de cerebro y corazón (BHI); después de la inoculación los tubos se incubaron durante 24 horas a 37°C y se estandarizó a una población de Mc Farland de 0,5 que equivale a 1.5×10^8 UFC (Taraco et al., 2011).



: *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

Fotografía 1. *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Fuente. Este estudio

6.3 Evaluación de las pruebas de inhibición mediante el método de microdilución en caldo colorimétrico en caja de elisa

Se utilizó el método microdilución en caldo para medir la concentración mínima de inhibición de las bacterias utilizando como agentes antimicrobianos los tres aceites esenciales de eucalipto, cáscaras de limón y mandarina.

Con las emulsiones obtenidas se realizó el inóculo en cada uno de los pozos de la caja variando las concentraciones de aceite con el fin de encontrar la mínima concentración inhibitoria. Las concentraciones más altas y más bajas de la prueba fueron 2,8 y 16,6 μL , también se prepararon dos controles en las primeras columnas para tener un parámetro de comparación: el control positivo se trata de un pozo en el cual se encuentra el inóculo bacteriano (10 μL) mas 100 μL de medio de cultivo BHI y 10 μL del antibiótico específico para cada bacteria; el control negativo consiste en un pozo que contiene únicamente el inóculo bacteriano (10 μL) más el medio de cultivo (100 μL).

La caja de Elisa tiene 96 pozos (12x8) con una capacidad de volumen de 200 μL por pozo, de tal manera que cada pozo equivale a una concentración diferente del agente antimicrobiano, en este sentido el volumen de cada pozo en el ensayo fue de 120 μL , de los cuales 10 μL corresponden al inóculo bacteriano previamente activado y estandarizado a una población de 1.5×10^8 UFC más 100 μL de cada emulsión y 10 μL del indicador colorimétrico; las pruebas se realizaron con cuatro repeticiones para cada concentración de aceite.

Como indicador colorimétrico se utilizó solución de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) (M2128-100MG Sigma aldrich) el cual se preparó 24 horas antes de la prueba de inhibición adicionando 5 mg por cada mL de agua estéril y homogenizando durante 5 minutos en vortex, una vez preparado se almacenó en frío y evitando la luz.

En el ensayo de inhibición, se adicionó 10 μL del indicador colorimétrico en cada pozo, las muestras se incubaron a 37°C por una hora para mirar el cambio de color en donde una apariencia de color rojo intenso indicó que hay crecimiento de microorganismos, es decir que hay bacterias viables; si por el contrario no se presentó cambio de color significa que no hubo crecimiento bacteriano, por consiguiente la mínima concentración inhibitoria corresponde al pozo que contenga la concentración mínima de aceite donde no se evidenció ningún cambio de color.

6.4 Prueba confirmatoria.

Se inoculó 10 μL de las muestras que no presentaron cambio de color en agar Muller Hilton y se incubó a 37°C durante 18 horas para confirmar la ausencia de bacterias viables.

- **Diagramas de flujo del proceso.**



Diagrama 1. Parámetros de formulación de la emulsión.

Fuente. Este estudio



Diagrama 2. Microorganismos y condiciones de crecimiento

Fuente. Este estudio

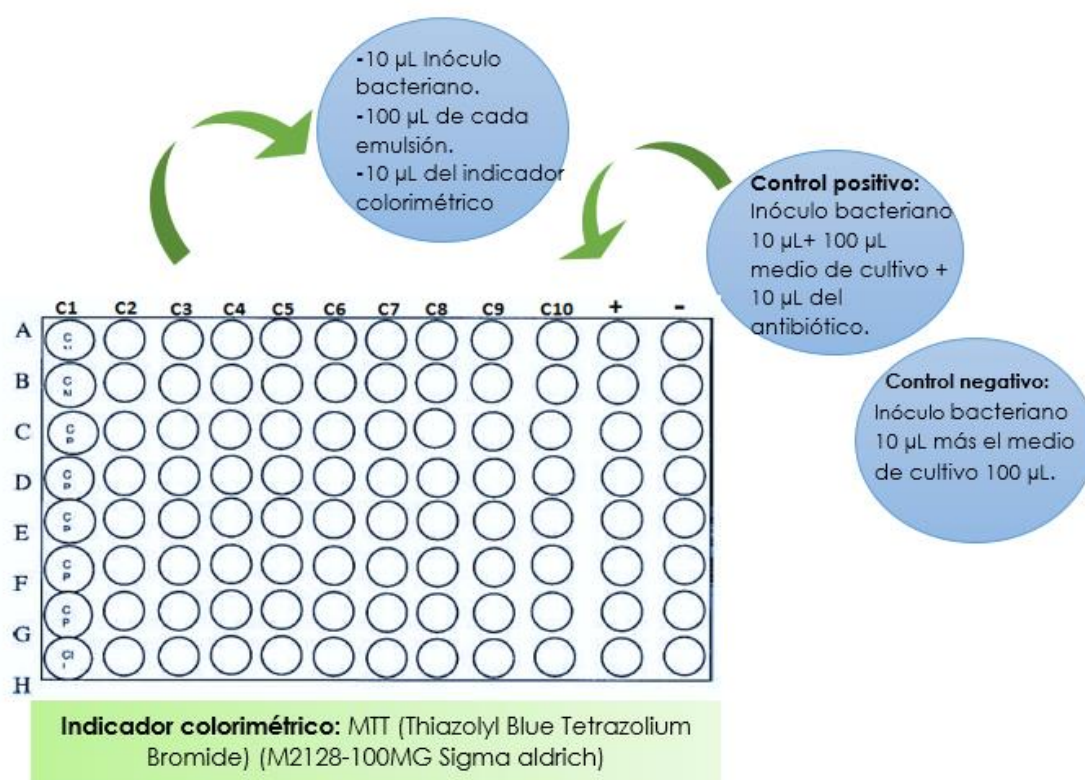


Diagrama 3. Mínima concentración inhibitoria mediante microilucion en caja de Elisa

Fuente. Este estudio

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Formación de la emulsion

En los ensayos realizados se determinó que la relación 1:1 entre aceite esencial y Tween 20 mostró estabilidad hasta 48 horas durante las cuales se realizó el seguimiento, como parámetro adicional se midió el tamaño promedio de partícula el cual se mantuvo entre un rango de 30 a 70 micras durante el tiempo.

El principal problema a la hora de determinar la resistencia de los aceites esenciales en cuanto a las propiedades antibacterianas es su naturaleza hidrófoba que los hace insolubles en medios a base de agua. En este sentido con el fin de obtener una mezcla homogénea del antibacteriano y el medio de dilución se puede resolver realizando una emulsión que permita la coexistencia de sus componentes los cuales generalmente son sustancias hidrofílicas e hidrofóbicas más emulsionantes tales como Tween 20 o 80 solo o en combinación con acetona, polietilenglicol o etanol (Burt, 2004; Fisher y Phillips, 2006)

En la tabla 5 y 6 se muestra las proporciones de cada componente dentro de la emulsión asignada para los microorganismos de estudio conservando la relación 1:1 de aceite y Tween 20 planteada inicialmente.

Tabla 5.***Cantidades en μL de cada componente de la emulsión para *Staphylococcus aureus*.***

ACEITE (μL)	MEDIO DE CULTIVO (μL)	TWEEN 20 (μL)
8,4	2983,2	8,4
10,2	2979,6	10,2
12,0	2976	12,0
13,8	2972,4	13,8
15,6	2968,8	15,6
17,4	2965,2	17,4
19,2	2961,6	19,2
21,0	2958	21,0
22,8	29454,6	22,8
26,4	2947,2	26,4

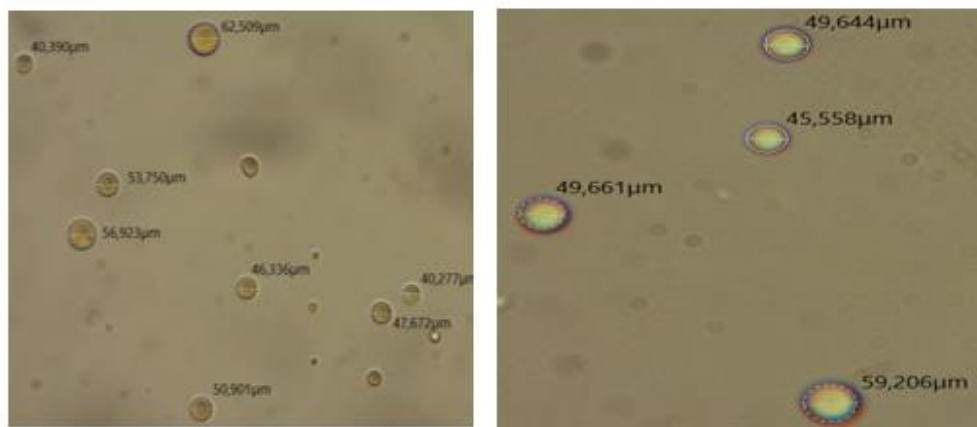
Fuente. Este estudio

Tabla 6.***Cantidades en μL de cada componente de la emulsión para *Escherichia coli*.***

ACEITE (μL)	MEDIO DE CULTIVO (μL)	TWEEN 20(μL)
6,3	2987,4	6,3
11,0	2977,9	11,0
15,7	2968,6	15,7
20,4	2959,2	20,4
25,2	2949,6	25,2
29,9	2940,2	29,9
34,6	2930,7	34,6
39,3	2921,4	39,3
44,0	2912,0	44,0
48,8	2902,4	48,8

Fuente. Este estudio

Debido a los parámetros que se determinaron para la formación de la emulsión se puede atribuir que ésta presentó algunas propiedades significativas para el estudio como es la mínima cantidad de tensoactivo en la emulsión lo cual se debe considerar ya que se pudo evidenciar estabilidad hasta los dos días y por otra parte se evidenció que el tamaño de partícula no varió considerablemente como se muestra en la fotografía 2 , en este sentido el tamaño reducido de la partícula permite penetrar con mayor facilidad la membrana celular con lo que aumenta la actividad antimicrobiana(Weiss, Gaysinksy, Davidson, y McClements, 2009).



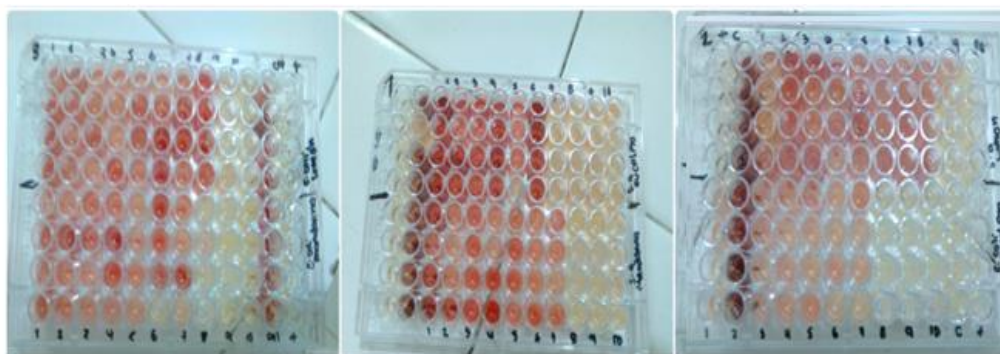
Fotografía 2. Diámetro medio y distribución de la molécula en la emulsión evaluada a 40X en 24 y 48 horas

Fuente. Este estudio

Las emulsiones de aceite en agua son vehículos importantes para el suministro de compuestos hidrófobos en una gama de productos alimenticios, nutracéuticos, cosméticos y fármacos (McClements, 2004). De la investigación realizada, la metodología basada en la preparación de mezclas de aceites naturales y el agua o el medio de cultivo líquido tiene un enfoque que genera una alternativa para preparar nuevas formulaciones a escalas mínimas en este caso de un compuesto antimicrobiano que podría ser adoptado para reemplazar o incluso, reducir al mínimo la dependencia excesiva de los agentes antibacterianos químicos cuyos efectos secundarios están bien establecidas.

7.2 Inhibición bacteriana

En este trabajo se evaluó la mínima concentración inhibitoria de los aceites esenciales de eucalipto (*eucalyptus*), cáscara de limón (*citrus limón*) y mandarina (*citrus reticulata*) contra cepas ATCC de microorganismos patógenos *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus* seleccionados por su relevancia como contaminantes alimentarios.



Fotografía 3: Resultados prueba de susceptibilidad bacteriana-caja de Elisa

Fuente. Este estudio

En la fotografía 3 se muestran los resultados de la prueba de inhibición bacteriana a través de microdilución en caja de Elisa; a la izquierda ensayos con aceite esencial de limón y mandarían para *E.coli*; en la parte central *S. aureus* con los aceites de mandarina y eucalipto; a la izquierda *S. aureus* con aceite esencial de limón y *E.coli*; con aceite de eucalipto. Los pozos donde no se observa ningún cambio de color indican la ausencia de bacterias viables.

Tabla 7.

Mínima concentración inhibitoria de aceites esenciales de eucalipto, cascara de limón y mandarina

Tabla 7: Mínima concentración inhibitoria (µL/mL) de aceites esenciales de Eucalipto, cascara de Limón y Mandarina		
Aceite Esencial	S. a	E. c
Eucalipto	6,4(C7)	13,1(C8)
Limón	7,6(C9)	14,6(C9)
Mandarina	7,0(C8)	13,0(C8)

S. a : *Staphylococcus aureus*; *E. c*: *Escherichia coli*

Fuente. Este estudio

En la Tabla 7 se muestra la concentración mínima de inhibición de cada aceite esencial frente a las bacterias patógenas, el aceite esencial de eucalipto presenta la mayor eficacia antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* con la menor concentración inhibitoria (6,4 µL/mL); frente a la

bacteria patógena *Escherichia coli* esta presentó la misma susceptibilidad (13,1 $\mu\text{L/mL}$) tanto para el aceite esencial de eucalipto como para el de cáscara de mandarina.

los resultados encontrados no son diferentes a otros estudios que se han realizado en cuanto a inhibición bacteriana ya que se ha demostrado que las bacterias Gram positivas son más susceptibles a diferentes tipos de aceites esenciales que las bacterias Gram negativas, esto se evidencia claramente en el resultado de la mínima concentración de aceite para inhibir a la bacteria *Staphylococcus aureus* como bacteria Gram positiva; *Escherichia coli* fue más resistente frente a las concentraciones propuestas, sin embargo los aceites esenciales de eucalipto y la cáscara de mandarina lograron inhibir el crecimiento de esta como otras bacterias Gram negativas. (Angelo et al., 2015)

La tendencia de consumo actual está inclinada hacia el reemplazo de los conservantes químicos por alternativas naturales que brinden seguridad alimentaria, en este sentido se propone la utilización de los aceites esenciales de plantas y frutos cítricos como una solución para mejorar los métodos de conservación de alimentos en la industria alimentaria.

Los aceites esenciales de los cítricos se extraen de la piel de las frutas frescas, por lo tanto constituyen un subproducto de este tipo de industria alimentaria y la utilización de estos como agentes antimicrobianos contra bacterias patógenas no solo nos proporciona una alternativa de conservante natural sino que también maximiza el uso de los recursos existentes y minimiza los efectos adversos de los subproductos en el medio ambiente.

Se sabe que un aceite esencial es una mezcla de numerosos componentes y su bioactividad se relaciona con su composición y las interacciones entre sus componentes las cuales desempeñan un papel importante en cuanto al efecto bactericida, en este sentido numerosos estudios cromatográficos obtenidos en varios ensayos confirman que el componente más abundante en los cítricos como la naranja, limón y mandarina es el limoneno, monoterpeno que representa 65 a

97% del aceite, dependiendo de varios factores, principalmente el método de extracción, el tiempo de la recolección del material vegetal, y sobre todo el origen geográfico del aceite; para el caso del eucalipto como principal componente se destaca el eucliptol (Chutia et al., 2009, Fisher y Phillips, 2010, Bachir y Benali, 2012).

Los resultados obtenidos en cuanto a inhibición bacteriana tienen similitud con otros estudios realizados ya que los aceites esenciales de cáscara de mandarina y eucalipto demostraron mayor eficacia bactericida frente a las bacterias estudiadas. (Settanni et al., 2012, Chikhouné et al., 2013 y Angelo et al., 2015), sin embargo es importante tener en cuenta que la susceptibilidad de los microorganismos a los aceites esenciales se debe a diversos factores entre los cuales se destaca principalmente la composición del aceite esencial y la propia especie microbiana, es importante resaltar que la variabilidad en la composición química de los aceites esenciales puede cambiar de acuerdo a diferentes situaciones tales como: ambientales (climáticos, estacionales y geográficos), variaciones genéticas, el estado nutricional de la planta, el tiempo de la cosecha y el método de extracción (Azizi et al., 2010). Los aceites esenciales de las pruebas demostraron actividad antimicrobiana contra las bacterias transmitidas por alimentos, sin embargo *S. aureus* fue la bacteria más susceptible, mientras que *E. coli* mostró mayor resistencia. Algunos autores afirman que la mayor resistencia en las bacterias Gram-negativas podría atribuirse a las diferencias en la membrana celular de estos grupos de bacterias, de esta manera la membrana externa de las bacterias Gram-negativas tiene superficies altamente hidrofílicas, mientras que los extremos lipofílicos de la membrana celular de las bacterias Gram-positivas pueden facilitar la penetración por un compuesto hidrófobo (Sokovic et al., 2010).

El modo de acción de los aceites esenciales ha sido estudiado más sin embargo hasta hoy no se tiene total claridad de ello, en varias investigaciones se ha propuesto que la acción antimicrobiana de los aceites esenciales se puede atribuir a su capacidad de penetrar a través de membranas

bacterianas con el interior de la célula y así las propiedades funcionales de esta se ven interrumpidas, de esta manera cuando los compuestos del aceite esencial rompen la membrana celular empiezan a interactuar con los orgánulos que constituyen la bacteria interfiriendo en el metabolismo celular. (Bajpai et al., 2012; Guinoiseau et al., 2010).

Una de las características importantes de los aceites esenciales y sus componentes es la hidrofobicidad ya que permite separar los lípidos de la membrana celular bacteriana y así hacerla más permeable, la interacción de los componentes de los aceites esenciales con membranas celulares microbianas permite la inhibición del crecimiento de algunas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. (Friedly et al., 2009), dentro de las bacterias gram-positivas se destaca *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* las cuales son más susceptibles a los aceites esenciales que las bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella Enteritidis* (Soković et al., 2010). En base a esto, células Gram-negativas deben ser más resistentes a la acción de los aceites esenciales de plantas debido a que poseen una pared celular exterior hidrofílica, que ayuda a prevenir la penetración de compuestos hidrofóbicos (Ravichandran et al., 2011 y Kim et al., 2011).

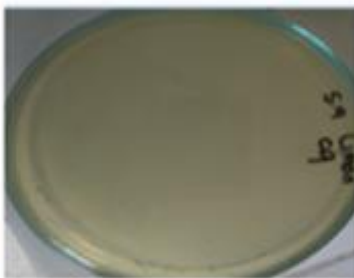
Por otra parte la naturaleza fenólica de los aceites esenciales también provoca una respuesta antimicrobiana frente a bacterias patógenas; los compuestos fenólicos interrumpen la membrana celular e inhiben las propiedades funcionales de la célula provocando la muerte celular, de la misma manera los compuestos fenólicos pueden alterar la permeabilidad celular microbiana, dañar las membranas citoplasmáticas, interferir con la energía celular en el sistema de generación de ATP e interrumpir la fuerza motriz de protones y con la permeabilidad alterada de la membrana citoplasmática se puede provocar la muerte celular (Bajpai et al., 2012, friedly et al, 2009 y Li et al, 2011).

7.3 Prueba confirmatoria

Transcurridas las 24 horas de incubación no se observó crecimiento de las bacterias como se puede observar en las siguientes imágenes.



*Inóculo bacteriano a concentración 6,4 $\mu\text{L/mL}$ de aceite esencial de eucalipto en *Staphylococcus aureus**



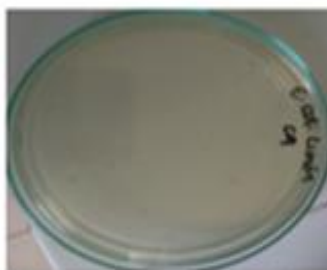
*Inóculo bacteriano a concentración 7,6 $\mu\text{L/mL}$ de aceite esencial de cascara de limón en *Staphylococcus aureus**



*Inóculo bacteriano a concentración 7,0 $\mu\text{L/mL}$ de aceite esencial de cascara de mandarina en *Staphylococcus aureus**



*Inóculo bacteriano a concentración 13,1 $\mu\text{L/mL}$ de aceite esencial de eucalipto en *Escherichia coli**



*Inóculo bacteriano a concentración 14,6 $\mu\text{L/mL}$ de aceite esencial de cascara de limón en *Escherichia coli**



*Inóculo bacteriano a concentración 13,1 $\mu\text{L/mL}$ de aceite esencial de cascara de mandarina *Escherichia coli**

8. CONCLUSIONES

El presente estudio nos ha permitido comparar la actividad antimicrobiana de tres tipos de aceites esenciales, el método microdilución en caldo colorimétrico a pesar de que no se trata de un proceso de detección cuantitativo es una herramienta adecuada para la selección e identificación de las concentraciones en las cuales se presentó inhibición bacteriana

Con la proporción 1:1 de aceite esencial y Tween 20 se logró conseguir una emulsión de un diámetro de partícula que va de 30 a 70 micras, y su estabilidad fue de 48 horas.

Las concentraciones mínimas inhibitorias fueron: para *Staphylococcus aureus*, con eucalipto 6,4 $\mu\text{L}/\text{ml}$; limón 7,6 $\mu\text{L}/\text{ml}$; mandarina 7,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$; para *Escherichia coli*, con eucalipto 13,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, limón 14,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$, mandarina 13,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Se logró comprobar que los aceites esenciales de eucalipto, cascara de limón y mandarina tienen capacidad inhibitoria para las bacterias *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Por último, el estudio señala el interés acerca del aprovechamiento de los productos de desecho de la industria de jugos y frutas, maximizando el uso de los recursos existentes y minimizar los efectos adversos de los subproductos en el medio ambiente.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda complementar este estudio con un análisis mediante técnicas cuantitativas para determinar la reducción de la población bacteriana.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Angelo. L, Andreia. D, Gominhob. J, Dominguesa. F, Duartea. A. (2015) *Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of Eucalyptus globulus and Eucalyptus radiata essential oils*. Industrial Crops and Products Volume 79, January, Pages 274–282
- Angiolillo L., Conte A., Del Nobile M.A. 2013. *Food Additives: Natural Preservatives. Encyclopedia of Food Safety*, pp 474–476
- Argudin. M.A, Mendoza. M.C, Rodicio. M.R. (2010), *Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins Toxins* pp. 1751–1773.
- Aruoma O.I., Stephen Coles L., Landes B., Repine J.E. (2012). *Functional benefits of ergothioneine and fruit- and vegetable- derived nutraceuticals: Overview of the supplemental issue contents*. Preventive Medicine, 54(1):S4-S8.
- Azizi. M Chizzola. R, Ghani. A, Oroojalian.F. (2010), *Composition at different development stages of the essential oil of four Achillea species grown* Natural Products Communications, 5 (2) pp. 283–290.
- Bachir. R, Benali. M. (2012). *Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of Eucalyptus globulus against Escherichia coli and Staphylococcus aureus* Asian Pac. J. Trop. Biomed., 2 pp. 739–742
- Bajpai V.K.,Kwang-Hyun B., Kang S.C. (2012). *Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review*. Food Research International, 45: 722-734.
- Brenes. A, Roura. E. (2010). *Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action* Animal Feed Science and Technology, 158 pp. 1–14

- Bousbia, N., Vian, M., , Ferhat, M.A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2011). *Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hidrodifusion and gravity*. Food chemistry. 114:355-362.
- Burt, S. (2004). *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review*. International Journal of Food Microbiology. 94:223-253.
- Callaway T.R, J.A Carroll, Arthington J.D, Edrington T.S, Anderson R.C, Ricke S.C. (2011). *Citrus products and their use against bacteria: potential health and cost benefits*. (chap. 17) R. Watson, J.L. Gerald, V.R. Preedy. (Eds.), Nutrients, dietary supplements, and nutraceuticals: Cost analysis versus clinical benefits, Humana Press, New York, NYpp. 277–286.
- Chikhoune. A, Hazzit. M, Kerbouche. L, Baaliouamer. A, Aissat. K. (2013). *Tetraclinis articulata (Vahl) masters essential oils: chemical composition and biological activities* Journal of Essential Oil Research, 25, pp. 300–307.
- CLSI (2012). PERFORMANCE Standars for Antimicrobial Suceptibility Testing; Twenty-Second informational Supplement (vol. 32, p 186) Wayne, Pensilvania USA.
- Chua , M. T., Tung, Y. T. y Chang, S. (2009). *Antioxidant activities, of ethanolic extracts from the twings of Cinnamomum Osmopholeum*. Bioresource Tegnology, 99:1918-1925.
- Chutia. M, Deka Bhuyan. P, Pathak. M.G, Sarma T.C, Boruah. P. (2009) *Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India* LWT - Food Science and Technology, 42 (3), pp. 777–780.
- Danielsson I and Lindman B (1981). The definition of microemulsion
Colloids and Surfaces, 3 (4), pp. 391–392

- Dembitsky V.M., Poovarodom S., Leontowicz H., Leontowicz M., Vearasilp S., Trakhtengerb S., Gorinstein S. (2012). The multiple nutrition properties of some exotics fruits: *Biological activity and active metabolites*. *Food Research International*, 44:1671- 1701.
- Espina. L., Solonimos, M., Lorán, S., Conchelo, P., Garcia , D. y Pagán, R. (2011). *Chemical composition of comercial citrus fruits esential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes*. *Food control*. 22:896-902.
- Fisher K, Phillips C (2006).*The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of Campylobacter jejuni, Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus and Staphylococcus aureus in vitro and in food systems*. *Journal of Applied Microbiology*, 101 (6) pp. 1232–1240.
- Friedly. E.C, Crandall- P.G, Ricke. S.C. (2009). Roman.M, O'Bryan. C, Chalova. V. *In vitro antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids*. *Journal of Food Science*, 74 pp. M67–M72.
- Gyawali. R, Ibrahim.S (2014).*Natural products as antimicrobial agents*
Food Control, 46 pp. 412–429
- Goldbeck. J, Nascimento. J, Jacob.R, Fiorentini. A, Silva. W. (2014), *Bioactivity of essential oils from Eucalyptus globulus and Eucalyptus urograndis against planktonic cells and biofilms of Streptococcus mutans*. *Ind. Crops Prod.*, 60 pp. 304–309.
- Guinoiseau. E, Luciani. A, Rossi. P.G, Quilichini.Y, Ternengo. S, Bradesi. P. (2010). *Cellular effects induced by Inula graveolens and Santolina corsica essential oils onStaphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29 pp. 873–879

- Guan, W., Li, S. Y Quank, C. (2007). *Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and the traditional estraction methods*. Food chemistry. 101:1558-1564
- Hennekinne. J.A., Buyser M.L (2012). *Dragacci S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation FEMS Microbiol. Rev.* pp. 815–836
- Kim S.-Y, Kang D.-H, Kim J.-K, Ha Y.-G, Hwang J.Y, Kim. T. (2011). *Antimicrobial activity of plant extracts against Salmonella Typhimurium, Escherichia coli O157:H7, and Listeria monocytogenes on fresh lettuce* Journal of Food Science, 76 pp. M41–M46.
- McClements, D.J (2000) Food emulsions: principles, practice and techniques; CRC Press, Boca Raton.
- McClements (2012) D,J *Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities* Soft Matter, pp. 1719–1729.
- Mercado M, Ávila J, Rey M, Montoya M, Gamboa A, Carrascal AK, Correa DX. (2012). *Brotes por Salmonella spp., Staphylococcus aureus y Listeria monocytogenes asociados al consumo de pollo*. Biomedica. 32(3):375-85.
- Moreira M, Ponce. A, Roura S. (2009) Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 38 pp. 565–570
- Moulik, B. Paul (1998). Structure, dynamics and transport properties of microemulsions *Advances in Colloid and Interface Science*, 78 (2) pp. 99–195
- Musa. N, Wei. L.S, Wee. W. (2008) *Phenotypic and genotypic characteristics of Vibrio harveyi isolated from black tiger shrimp (Penaeus monodon)* World Appl. Sci. J., 3 (6), pp. 885–902

- Nannapaneni. R, Chalova. V, Crandall. P, Ricke. S, Johnson. M, O'Bryan. M (2010). *Campylobacter and Arcobacter species sensitivity to commercial orange oil fractions* International Journal of Food Microbiology, 129 (1) pp. 43–49
- Li.M, Muthaiyan. A, O'Bryan C.A, Gustafson. J.E, Li. Y, Crandall P.G. (2011), *Use of natural antimicrobials from a food safety perspective for control of Staphylococcus aureus.* Current Pharmaceutical Biotechnology, 12 pp. 1240–1254
- Lorian V. (2005) Amsterdam D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. Antibiotics in laboratory medicine. 4^a ed. 1996. pp 52-111.
- Palomino, A. y Cerpa, M. Hidroextracción de los aceites esenciales. Memorias de la IV. Reunión de Fenómenos de Transporte. Callao, Perú, 2000.
- Park. S. (2008). *Pathogenicity of Vibrio harveyi to cultured marine fishes in Korea* Aquaculture, 285 pp. 8–13
- Prakash. B, Media.A, Mishra.P, Dubey. N, (2015) *Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – potentials and challenges* Food Control, 47, pp. 381–39.
- R.J. Murray. (2005). *Recognition and management of Staphylococcus aureus toxin-mediated disease* Intern. Med. J., S2, pp. 106–119.
- Rao. J , McClements .D.J (2011) *Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Influence of composition and preparation method.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (9) (2011), pp. 5026–5035.
- Ravichandran. M, Hettiarachchy. N.S, Ganesh. V, Ricke S.C, Singh.S. (2011). *Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7 and SalmonellaTyphimurium in broth and chicken meat system.* Journal of Food Safety, 31 pp. 462–471.

- Rodríguez.J, Cantón. M, Sánchez. Gómez. M, Martínez L, Rodríguez. C, Vila.(2000) *Metodos basicos para el studio de la sensibilidad a los antimicrobianos.*
- Settanni. J, Palazzolo. P. Guarrasi. E, Aleo. V, Mammina. C, Moschetti. G (2012). *Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily* Food Control, 26 pp. 326–330.
- Soković. M, Glamočlija. J, Marin P.D, Brkić D, van Griensven L.J.L.D. (2010), Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model .Molecules, 15 pp. 7532–7546
- Solorzano F, Miranda MG. (2011). *Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents.* *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 16
- Taroco .R, Seija. V, Vignoli. R,(2011). *Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica*
- Varona S, Rodríguez Rojo S, Martín Á, Cocero MJ, Serra AT, Crespo T, et al. (2013) *Antimicrobial activity of lavender essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria.* *Industrial Crops and Products* 3;42(0):243-250
- Vatai, T., Skerget, M. y Knez, Z.(2009). *Extraction of phenolic compounds from elderberry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide.* *Journal of food engineering* 90: 246-254.
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J. (2008). *Antifungal activity of lemon (Citrus Lemon L.), mandarin (Citrus reticulata L.), grapefruit (Citrus paradisi L.) and orange (Citrus sinensis L.) essential oils.* *Food Control*,19: 1130- 1138.
- Wang Y, Zhao. R, Yu. L, Zhang Y, He Y, Yao. J (2014), Evaluation of cinnamon essential oil microemulsion and its vapor phase for controlling postharvest gray mold of pears (*Pyrus pyrifolia*) *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (5) pp. 1000–1004.