

Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Evaluation of the inability capacity of essential oils in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Capacidade de avaliação inibitório de óleos essenciais em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

FRANCISCO EMILIO ARGOTE-VEGA¹, ZULLY JIMENA SUAREZ-MONTENEGRO²,
MAGALY ELIZABETH TOBAR-DELGADO³, JOSE ANGEL PEREZ-ALVAREZ⁴,
ANDRES MAURICIO HURTADO-BENAVIDES⁵, JOHANNES DELGADO-OSPINA⁶

Recibido para evaluación: 14 de Marzo de 2017.

Aprobado para publicación: 29 de Agosto de 2017.

- 1 Universidad de Nariño, Grupo de investigación TEA, Doctorando en Recursos y Tecnologías Agroalimentarias. Magíster en Marketing Agroindustrial. San Juan de Pasto, Colombia.
- 2 Universidad de Nariño, Grupo de investigación TEA. Magíster en Marketing Agroindustrial. San Juan de Pasto, Colombia.
- 3 Universidad de Nariño, Grupo de investigación TEA. Ingeniera Agroindustrial. San Juan de Pasto, Colombia.
- 4 Universidad Miguel Hernández de Elche, Grupo de investigación Industrialización de productos de origen animal. Ph.D. Tecnología de alimentos. Alicante, España.
- 5 Universidad de Nariño, Grupo de investigación TEA. Ph.D. Ciencia y Tecnología de alimentos e Ingeniería. San Juan de Pasto, Colombia.
- 6 Universidad de San Buenaventura sede Cali, Grupo de investigación de Biotecnología. Magíster en Ciencias Agrarias. Cali, Colombia.

Correspondencia: argote_71@hotmail.com

RESUMEN

El interés por los aceites esenciales ha aumentado notablemente por sus propiedades bactericidas, fungicidas y antioxidantes. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antibacteriana de aceites esenciales de eucalipto, limón y mandarina frente a bacterias ATCC *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. La actividad antibacteriana se determinó con la concentración mínima inhibitoria CMI y bactericida CMB, mediante el método de microdilución, con una emulsión estable cuyo diámetro promedio de gota estuvo entre 40 y 63 micras. La composición se determinó por cromatografía de gases acoplado a masas, también se midió la densidad, índice de refracción y acidez. Como resultados, se encontró para los aceites, valores de densidad entre $0,858 \pm 0,002$ y $0,920 \pm 0,003$ g/cm³, índice de refracción de $1,469 \pm 0,01$ y $1,4595 \pm 0,0025$, índice de acidez entre $5,32 \pm 0,02$ y $8,08 \pm 0,074$; la composición de limón y mandarina presentaron compuestos comunes como limoneno, terpineno, octanal y mircenol; en eucalipto se destacaron eucalyptol (1,8 cineol) y pineno. En conclusión, los mejores resultados de inhibición fueron para eucalipto y mandarina frente a la bacteria Gram positiva con una CMI y CMB de $6,8 \mu\text{L/mL}$ y para la Gram negativa el aceite esencial de cascara de mandarina y eucalipto con una CMI y CMB de $13,2 \mu\text{L/mL}$.

ABSTRACT

The study of essential oils has increased markedly for its bactericidal, fungicidal and antioxidant properties. The objective was to evaluate the antibacterial capacity of essential oils of eucalyptus, lemon and mandarin against bacteria ATCC *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The antibacterial activity was determined with the minimal inhibitory concentration MIC and bactericidal MBC by the microdilution method, with a stable emulsion whose average droplet diameter was between 40 and 63 microns. The composition was determined by gas chromatography coupled to mass, the density, refractive index and acidity were also measured. The results were found for the oils density values between $0,858 \pm 0,002$ and $0,920 \pm 0,003$ g/cm³, refractive index of $1,469 \pm 0,01$ and $1,4595 \pm 0,0025$, acid value between $5,32 \pm 0,02$ and $8,08 \pm 0,74$; the composition of lemon and mandarin presented common compounds such as limonene, terpinene, octanal and myrcene, eucalyptol (1,8 cineole) and pinene were prominent in eucalyptus. The best inhibition results were for eucalyptus and mandarin versus Gram positive bacteria with a MIC and MBC of $6,8 \mu\text{L/mL}$ and for Gram negative the essential oil of mandarin and eucalyptus peel with a MIC and MBC of $13,2 \mu\text{L/mL}$.

RESUMO

O estudo de óleos essenciais aumentou significativamente devido às suas propriedades antibacterianas e antioxidantes, fungicidas. O objetivo foi avaliar a capacidade antibacteriana de óleos essenciais de eucalipto, limão e tangerina contra bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC e *Escherichia coli*. A atividade antibacteriana foi determinada pela CIM a concentração mínima inibitória e CMB bactericida pelo método da microdiluição com uma

PALABRAS CLAVES:

Bactericida, Emulsión, Inhibición, Microdilución, Quimiotipo

KEYWORDS:

Bactericide, Emulsion, Inhibition, Microdilution, Chemotype

PALAVRAS-CHAVE:

Bactericida, Emulsão, Inibição, Microdiluição, Chemotype

emulsão estável com um diâmetro médio de gota era entre 40 e 63 microns. A composição foi determinada por cromatografia em fase gasosa acoplada à massa, densidade, índice de refração e a acidez foi medida. Como resultado, foi encontrado com os valores óleos de densidade entre $0,858 \pm 0,002$ e $0,920 \pm 0,003$ g/cm³, índice de refração de $0,01 \pm 1,469$ e $1,4595 \pm 0,0025$, número de ácido entre $5,32 \pm 0,02$ e $8,08 \pm 0,074$; a composição de limão e tangerina apresentado compostos comuns, tais como limoneno, terpinene, octanal e mirceno, em eucalipto eucalipto (1,8 cineol) e pineno foram destacados. Os melhores resultados foram para o eucalipto inibição e tangerina contra bactérias Gram positivas com um MIC e MBC de $6,8 \mu\text{L/mL}$ e Gram negativo para o óleo essencial de eucalipto e casca de tangerina com um MIC e MBC $13,2 \mu\text{L/mL}$.

INTRODUCCIÓN

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 y composición de nutrientes, con la consecuente reducción del 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 incluyen cereales, granos, nueces, frutas, verduras, carnes y especias, se reportan en cifras equivalentes a toneladas métricas de alimentos cada año [1].

Gran cantidad de bacterias patógenas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, en reservorios acuáticos y animales, los cuales son una importante fuente de patógenos [2]. Entre otros *Escherichia coli* ha sido identificado como el principal agente etiológico responsable de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos; esta bacteria está asociada 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 [2].

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 dan lugar a 2,2

millones de muertes afectando mayoritariamente a la población infantil, desencadenando así el problema de salud pública más extendido mundialmente [3].

No obstante, con el fin de garantizar la seguridad alimentaria, existe la necesidad de generar medidas de control eficaces con conservantes antimicrobianos, que garanticen la inactivación bacteriana y que a su vez no generen efectos secundarios por su consumo; los métodos de conservación de alimentos que estén exentos de productos químicos pero que presenten 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 controlan el desarrollo microbiano, generan gran debate por los efectos secundarios en 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 han demostrado una importante actividad bacteriana frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos [4].

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos aromáticos que se obtienen por diferentes métodos de extracción, a partir de material vegetal (flores, tallos, raíces, hojas, frutos, y semillas), algunos de ellos indican actividad antibacteriana y antifúngica, evaluadas como una fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos y una alternativa para la preservación de alimentos [5].

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se encuentra relacionada con la composición química, por ejemplo, frutos cítricos cuentan con un promedio de 40 compuestos, los cuales se ven influenciados por métodos específicos de cultivo, extracción y separación; los aceites esenciales de cítricos se encuentran principalmente en la cáscara de la fruta, su extracción es económicamente sostenible, ya que 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 [6].

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. au-*

reus, *Campylobacter*, *Enterococcus fecalis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, y otros [7].

Los aceites de frutos cítricos han sido evaluados como posibles alternativas a los antimicrobianos basados en productos químicos, es así como su estudio es relativamente hace poco, haciendo énfasis en los componentes que lo constituyen, en especial en el quimiotipo limoneno, el cual ejerce un amplio espectro en actividad antimicrobiana, demostrando ser eficaz frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. entérica* y *Saccharomyces bayanus* [8].

El objetivo de esta investigación fue evaluar 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.

MÉTODO

Formulación de la emulsión

Los aceites esenciales de Eucalipto (*Eucalyptus*), cáscara de limón (*Citrus limón*) y mandarina (*Citrus Reticulata*) se obtuvieron mediante el método de hidrodestilación y las variables de la operación fueron: densidad de lecho (Diámetro de recipiente 30 cm), relación agua a material vegetal de 5:1, temperatura promedio de $90 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ y un tiempo aproximado de 2,5 horas para cada extracción. El proceso se realizó en lotes de 400 g de material vegetal hasta alcanzar 10 mL de aceite; las muestras se sometieron a análisis de densidad, índice de refracción e índice de acidez de acuerdo a las normas NTC 336 y NTC 218, posteriormente se almacenaron a temperatura promedio de $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

La composición de los aceites esenciales se efectuó con la ayuda de un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas marca Shimadzu QP2010S, provisto de columna J&W Scientific DB5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) y detector Selectivo de masas, en modo de operación *full scan*; interface a 280°C ; inyector *split/splitless* a 250°C Inyección *split* 1:50; fase móvil Helio UAP a flujo de 1,0 mL/min.

Inicialmente, se inyectó 1,0 μL de aceite esencial (dilución al 10% en diclorometano grado HPLC). Luego se procedió a la identificación tentativa de los compuestos mediante comparación de los espectros de

masas utilizando las bases de datos ADAMS 2004 y NIST. Para el cálculo de los índices de retención lineales se utilizó una mezcla de n-alcenos.

Las emulsiones se elaboraron a partir de la mezcla del aceite esencial más un medio de cultivo líquido (caldo infusión cerebro corazón BHI) el cual permitía el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, como tensoactivo o emulsionante se utilizó Tween 20. Las variables de operación en la preparación de la emulsión como la temperatura, velocidad y tiempo de agitación fueron constantes, variando únicamente la proporción del aceite respecto al Tween 20 de la siguiente forma: 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:3; la unidad muestral fue de 3 mL con ensayos por triplicado. La emulsión resultante se observó al microscopio con un objetivo de imagen de 40x y 100x, verificando su estabilidad termodinámica durante 48 horas con el fin de evidenciar defectos tales como la sedimentación, coalescencia y floculación durante el almacenamiento [10].

Para determinar las concentraciones de estudio de los aceites esenciales, se realizó un intervalo de datos con límites inferior y superior para *Staphylococcus aureus* entre 2 y 9,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$, y con *Escherichia coli* en intervalo de 2 y 14,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Microorganismos y condiciones de crecimiento

La capacidad de inhibición bacteriana de los aceites esenciales de Eucalipto, cáscara 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 previa a su activación.

Para la activación bacteriana se realizaron inóculos adicionando 10 μL de cada bacteria en 10 mL del medio de cultivo líquido de infusión de cerebro y corazón (BHI), se incubaron durante 24 horas a 37°C y se estandarizó a una población de Mc Farland de 0,5 que equivale a UFC /mL [11].

Concentración mínima inhibitoria mediante micro dilución en caja de Elisa

Se empleó una caja de elisa de 96 pozos con una capacidad en cada pozo de 200 μL . Inicialmente se montaron dos controles, estos correspondían a un control positivo (medio de cultivo y bacteria), y aun

negativo igual al primero más los antibióticos que contrarrestan la resistencia de la bacteria (*Staphylococcus aureus* con oxácilina 5 µg/mL y para *Escherichia coli* ampicilina 2 - 8 mg/mL) [9]. Los pozos donde varía la concentración de aceite tuvieron un volumen final de 120 µL, de los cuales 10 µL corresponden al inóculo bacteriano más 100 µL de cada emulsión, posteriormente las cajas se incubaron a 35°C durante 20 horas. Como indicador colorimétrico de inhibición se empleó MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) (M2128-100MG Sigma aldrich), el cual se adicionó a cada pozo, incubando durante una hora a 37°C y observando cambios de turbidez para determinar si se presentó concentración mínima inhibitoria. Las experiencias se realizaron por triplicado

La concentración mínima bactericida se determinó inoculando 10 µL de muestra de un pozo que no presentó cambio de color en agar Muller Hilton y se incubó a 37°C durante 18 horas para confirmar la ausencia de bacterias viables en caja Petri por triplicado.

Análisis estadístico

Se realizó con la ayuda del programa Statgraphics Centurión XVII. Los resultados se expresan en promedios con su desviación estándar, las diferencias estadísticas se compararon a un valor $P < 0,05$ con análisis de varianza y prueba de múltiples rangos de Tukey. Los resultados de inhibición bacteriana se realizaron con un diseño completamente al azar con dos factores y las diferencias significativas se compararon con la prueba de kruskall Wallis a un valor $P < 0,05$.

RESULTADOS

Características físicas y químicas

En el cuadro 1 se puede observar que la densidad de los aceites presentó diferencias significativas, el mayor valor fue para el aceite de eucalipto, mientras que limón y mandarina muestran valores similares. En lo referente al índice de refracción no se observan diferencias significativas en los tres tipos de aceites. Por otra parte, el índice de acidez indicó diferencias significativas para el aceite de eucalipto comparado con los aceites de mandarina y limón, ya que estos dos últimos presentan valores similares.

Composición de aceites

Como se puede observar en el cuadro 2, en los aceites de limón y mandarina existen compuestos comunes los cuales corresponden a limoneno, terpineno, octanal y mirceno.

En mandarina es importante destacar los quimiotipos linalool (*dimethyl-2,7-octadien-6-ol.*) y timol (*2-isopropil-5-metilfenol*) ampliamente estudiados por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas. Por otra parte en el aceite de eucalipto son importantes los terpenos eucaliptol (*1,8 cineol*) y pineno. Estudios realizados por varios investigadores reportan

Cuadro 1. Características físicas y químicas de aceites.

Aceite	Densidad Promedio g/cm ³	Índice de refracción promedio	Índice de acidez promedio
Eucalipto	0,920±0,003 ^b	1,4595±0,0025 ^a	5,32±0,02 ^a
Mandarina	0,860±0,001 ^a	1,469±0,01 ^a	8,08±0,074 ^b
Limón	0,858±0,002 ^a	1,471±0,021 ^a	7,77±0,096 ^b

Nota: letras minúsculas diferentes en filas representan diferencias significativas con prueba de Tukey a $P < 0,05$.

Cuadro 2. Compuestos principales de aceites esenciales

Aceites esenciales	Nombre científico	Composición porcentual de principales compuestos
Limón	<i>Citrus limón (L) Osbeck</i>	Limoneno(58,17), β-pineno (13,22), γ-Terpineno (11,72), β-Mirceno (1,75), Octanal (1,67), Citronelal (1,5), α-Terpineol (1,19)
Mandarina	<i>Citrus reticulata blanco</i>	Limoneno (70,88), γ-Terpineno (7,14), Linalool (6,69), Octanal (3,52), β-Mirceno (2,79), Timol (1,25)
Eucalipto	<i>Eucalyptus spp.</i>	Eucaliptol (57,85), α-pineno (22,81), α-terpinil acetato (3,72), β-Mirceno (1,85), Viridiflorol (1,6), β-pineno (1,53), Aromadendreno (1,49), α-Terpineol (1,27)

Nota: Se referencian los compuestos con valores superiores al 1%.

que el efecto antimicrobiano de los compuestos obedece a un efecto sinérgico y no a las propiedades aisladas de uno de ellos.

Emulsiones

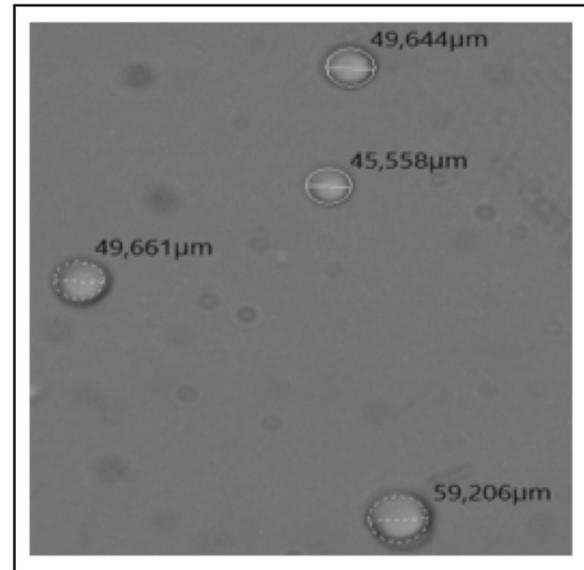
En los ensayos realizados se determinó que la relación 1:1 entre aceite esencial y Tween 20 mostró estabilidad hasta 48 horas durante las cuales se realizó el seguimiento; como parámetro adicional, se midió el tamaño promedio de gota el cual se mantuvo entre un rango de 40 a 63 micras durante el tiempo, como se puede observar en la figura 1.

Concentración mínima inhibitoria CMI

En la figura 2 se presenta los resultados de la prueba de inhibición bacteriana a través de microdilución en caja de Elisa. Imagen de Izquierda indica ensayos con aceite esencial de limón y mandarina en la bacteria *E.coli*; imagen central muestra resultados de *S. aureus* con mandarina y eucalipto; imagen derecha corresponde a *S. aureus* y *E.coli* con limón y eucalipto en su orden. Los pozos donde no se observa ningún cambio de color indican la ausencia de bacterias viables.

En el cuadro 3 se resume la concentración mínima de inhibición CMI y la concentración mínima bactericida CMB de cada aceite esencial frente a las bacterias patógenas, el aceite esencial de eucalipto y mandarina indican la menor CMI y CMB frente a *Staphylococcus aureus* (6,8 µL/mL). Respecto a la bacteria patógena *Escherichia coli* esta muestra susceptibilidad a los tres aceites, siendo menor para eucalipto y mandarina con valores de CMI y CMB de 13,2

Figura 1. Diámetro medio y distribución de la molécula en la emulsión evaluada a 40X en 24 y 48 horas.



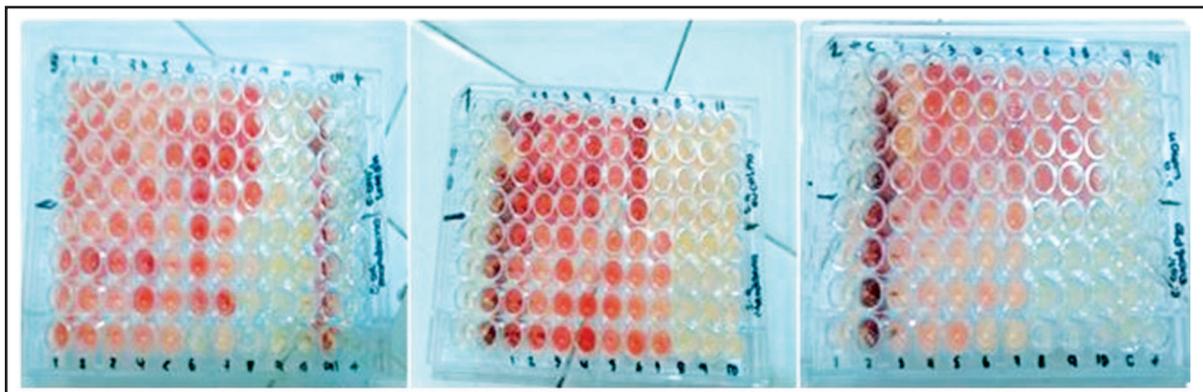
Las características de la emulsión fueron: 7,35 ±0,5 pH; índice de refracción 1,35445 ± 0,057 densidad 1,793 g/ cm³ ± 0,26.

Cuadro 3. Resultados de CMI y CMB para *S. aureus* y *E. coli*

Aceite	S.aureus		E.coli	
	CMI µL/mL	CMB µL/mL	CMI µL/mL	CMB µL/mL
Eucalipto	6,8 ^a	6,8 ^a	13,2 ^a	13,2 ^a
Mandarina	6,8 ^a	6,8 ^a	13,2 ^a	13,2 ^a
Limón	7,6 ^b	7,6 ^b	14,6 ^b	14,6 ^b

Nota: letras minúsculas diferentes en filas representan diferencias significativas de los tratamientos con la bacteria, prueba de kruskall Wallis a P<0,05.

Figura 2. Concentración mínima inhibitoria- caja de Elisa.



$\mu\text{L}/\text{mL}$. En esta investigación la concentración mínima inhibitoria CMI y la concentración mínima bactericida CMB coincidieron en el mismo valor. Las figuras 3 y 4 muestran los resultados de CMB para las bacterias de estudio.

El principal problema a la hora de determinar la eficiencia 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 resuelve elaborando una emulsión que permita la coexistencia de sus componentes los cuales generalmente son sustancias hidrófilas e hidrofóbas más tensoactivos tales como Tween 20 o 80 solo o en combinación con acetona, polietilenglicol o etanol [12].

Las emulsiones de aceite en agua son vehículos importantes para el suministro de compuestos hidrófobos en una gama de productos alimenticios, nutraceuticos, cosméticos y fármacos [13].

De la investigación realizada, la metodología basada en la preparación de mezclas de aceites esenciales y el medio de cultivo líquido, genera una alternativa para preparar nuevas formulaciones a escalas pequeñas, 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 establecidos [13].

Los resultados obtenidos de la concentración mínima inhibitoria no son diferentes a otros estudios

Figura 3. Concentración mínima bactericida CMB de aceites esenciales de eucalipto, limón y mandarina en cultivo de *Staphylococcus aureus*.

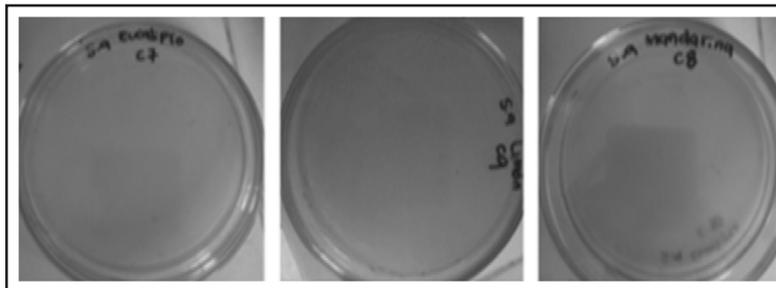
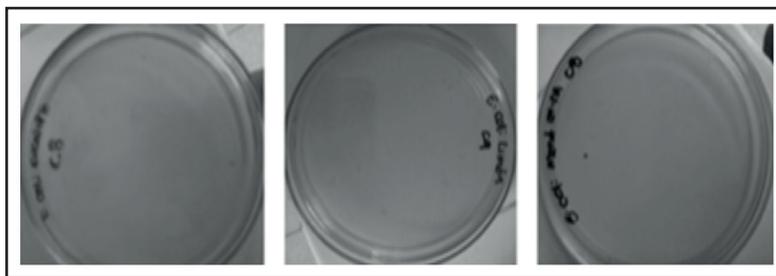


Figura 4. Concentración mínima bactericida CMB de aceites esenciales de eucalipto, limón y mandarina en cultivo de *E. coli*.



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 obtenido con 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 mandarina lograron inhibir el crecimiento de esta como de otras bacterias Gram negativas [14].

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 la industria alimentaria, y la utilización de estos como agentes antimicrobianos contra bacterias patógenas no solo proporcionan 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.

Es conocido 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, partiendo de esto,

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 el 65 al 97% del aceite, dependiendo de varios factores, principalmente del 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 eucaliptol [15].

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; 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 (clima, estaciones y posición geográfica), variaciones genéticas, el estado nutricional de la planta, el tiempo de la cosecha y el método de extracción [16].

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 [17].

El modo de acción de los aceites esenciales ha sido ampliamente estudiado, sin embargo no se tiene total claridad de ello, en algunos estudios se ha propuesto que la acción antimicrobiana de los aceites esenciales se puede atribuir a su capacidad de penetrar a través de membranas bacterianas y así interrumpir las propiedades funcionales de esta, interactuando con los orgánulos que constituyen el citoplasma de la célula bacteriana e interferir en el metabolismo celular [17].

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, por ejemplo en el primer grupo se destacan *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*, que son más resistentes a la acción de los aceites esenciales debido a que poseen una pared celular exterior hidrofílica, que ayuda a prevenir la penetración de compuestos hidrofóbicos [18].

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, con la permeabilidad alterada de la membrana citoplasmática se puede provocar la muerte celular [19].

CONCLUSIONES

El presente estudio permitió comparar la actividad antimicrobiana de tres tipos de aceites esenciales mediante el método de microdilución en caldo colorimétrico, la emulsión se obtuvo con una proporción 1:1 de aceite esencial y Tween 20 estable en 48 horas y con un diámetro de gota entre 40 y 63 micras.

Las concentraciones mínimas inhibitorias CMI y bactericidas CMB fueron: *Staphylococcus aureus*, con eucalipto y mandarina 6,8 $\mu\text{L}/\text{ml}$, limón 7,6 $\mu\text{L}/\text{ml}$. Con la bacteria *Escherichia coli*, eucalipto y mandarina 13,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y limón 14,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Los resultados demostraron 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.

REFERENCIAS

- [1] ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). Pérdidas y desperdicio de alimentos el mundo. Roma (Italia): 2015, 42 p.
- [2] SHAH, M.K. *et al.* Efficacy of vacuum steam pasteurization for inactivation of Salmonella PT 30, *Escherichia coli* O157:H7 and *Enterococcus faecium* on low moisture foods. *Food Microbiology*, 244, 2017, p.111-118.
- [3] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Inocuidad de los alimentos (Nota descriptiva N° 399) [online]. 2015. Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/> [citado 20 de Marzo del 2017].
- [4] PRAKASH, B. *et al.* Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – potentials and challenges. *Food Control*, 47, 2015, p. 381–389.
- [5] PERDONES, A. *et al.* Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage. *Food Chemistry*, 197, 2016, p. 979-986.
- [6] AL-JABRI, N.N. and HOSSAIN, M.A. Chemical composition and antimicrobial potency of locally grown lemon essential oil against selected bacterial strains. *Journal of King Saud University – Science*, 60(30), 2016, p. 1-7.
- [7] CHEN LIN, P., LEE, J.J. and CHANG, I. Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(3), 2016, p. 464-470.
- [8] MOHAMMADHOSSEINI, M., SARKER, S.D. and AKBARZADEH, A. Chemical composition of the essential oils and extracts of *Achillea* species and their biological activities: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 199, 2017, p. 257-315.
- [9] THE CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne (USA): Twenty-Second informational Supplement 2012, p. 32.
- [10] MCCLEMENTS, D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8, 2012, p. 1719–1729.
- [11] TAROCO, R., SEIJA, V. and VIGNOLI, R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica [online]. 2011. Disponible: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>. [citado 13 de Marzo del 2017].
- [12] FISHER, K. and PHILLIPS, C. 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), 2006, p.1232–1240.
- [13] SULLO, A. and NORTON, I.T. Food Colloids and Emulsions. Reference Module in Food Science, from *Encyclopedia of Food and Health*, 2016, p. 7-15.
- [14] ANGELO, L. *et al.* Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 79, 2016, p. 274–282.
- [15] OULD SI SAID, Z.B. *et al.* Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits. *Industrial Crops and Products*, 89, 2016, p. 167-175 .
- [16] SULTANBAWA, Y. En: *Essential Oils in Food Applications: Australian Aspects. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. 1 ed. Canberra (Australia): Academic press, 2016, p.155-160
- [17] BASSANETTI, I. *et al.* Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. *Food Control*, 73, 2017, p. 606-612.
- [18] RAVICHANDRAN, M. *et al.* Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in broth and chicken meat system. *Journal of Food Safety*, 31, 2011, p. 462–471.
- [19] AMBROSIO, C.M.S. *et al.* Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Industrial Crops and Products*, 97, 2017, p. 128-136.