

Universidad de Costa Rica
Facultad de Microbiología

Efecto inhibitorio de extractos de cítricos sobre
Pseudomonas aeruginosa y *Staphylococcus aureus*

María Adilia Sánchez Vargas

Tutor: José Antonio Gené Valverde

1995

Abstract: The juices and seeds of different citrus fruits were analyzed for its antibacterial effect against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. No effect was detected in the seeds as it was in the juices, being the *Citrus limon* (Lemon) the one with highest activity. The effect was stable at 80°C and to the presence of 1% serum. The antibacterial activity is pH dependent and is inhibited at pH higher than 3.0, though it seems to be caused by a another factor besides pH alone.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, citrus, inhibition, lemon juice.

INTRODUCCION

Se ha demostrado que diferentes extractos naturales de plantas poseen efectos biológicos importantes como por ejemplo la estimulación del sistema inmune (Kuttan,1993) , activación de la vía alterna del complemento (Unsworth,1993) , así como un efecto inhibitorio sobre algunos microorganismos al utilizarlos en la preparación de alimentos (Mata,1992¹, Rivera *et al.*,1994) . Este último efecto puede deberse a uno o más componentes que actúan directamente sobre los microorganismos, o indirectamente modificando condiciones que tienen algún efecto sobre los

microorganismos como es el caso del pH. La eficacia de los agentes antimicrobianos depende de diferentes factores como la concentración de materia orgánica, temperatura, concentración del agente activo, carga inicial microbiana y pH (Block, 1983).

Para controlar las poblaciones microbianas en los alimentos se utilizan diferentes productos algunos de los cuales son de origen natural y tienden a ser más aceptados por los consumidores, debido a que se presume que tienen menos efectos perjudiciales para la salud. Recientemente en Costa Rica se han utilizado productos comerciales cuyo ingrediente activo aparentemente se extrae de cítricos.

Por este motivo se decidió estudiar más a fondo el efecto antimicrobiano de estos extractos, así como la influencia de diferentes variables sobre el mismo; de tal modo que podamos determinar que fracciones de estas frutas pueden ser utilizadas como inhibidoras del crecimiento bacteriano y cuales son las condiciones óptimas bajo las que el producto actúa.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar el efecto inhibitorio de diferentes extractos de cítricos sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Objetivos Específicos:

Determinar el efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de los extractos.

Determinar el efecto de la materia orgánica y la temperatura sobre la actividad antimicrobiana del jugo de limón.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de jugo de limón sobre las bacterias en estudio.

Separación de las fracciones del extracto de jugo de limón utilizando una columna de Sephadex G-25 y por ultrafiltración con una membrana de 30 000 Daltons de límite de exclusión.

Determinación de la curva de titulación del jugo de limón con NaOH 1.0M.

Determinación de los ácidos orgánicos volátiles y no volátiles del jugo de limón.

MATERIAL Y METODOS

Cepas de Microorganismos :

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) se obtuvieron en la bacterioteca de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (San José, Costa Rica). Todos los cultivos utilizados fueron previamente incubados por 24 hr a 37°C en agar tripticasa y soya (ATS) o caldo tripticasa y soya (CTS) (Difco, Michigan, U.S.A)

Preparación de extractos vegetales:

Se utilizaron extractos acuosos de semillas, jugos y zumo. Para obtener los extractos de semillas se pesaron separadamente 10 g de semillas de naranja agria (*Citrus aurantium*), naranja dulce (*Citrus sinensis*) y toronja (*Citrus paradisi*), se llevaron a un volumen final de 60 ml con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) y se licuaron. Posteriormente se centrifugó para eliminar los residuos sólidos y se trabajó con los sobrenadantes. Todas las pruebas se realizaron con los extractos recién preparados.

En el caso del zumo de toronja, se tomaron 10 g de cáscara de toronja y se agregaron 10 ml de PBS. Se extrajo el contenido de la

cáscara macerándola por 10 min, se utilizó el sobrenadante en la prueba de difusión.

Para preparar los extractos de jugos de cítricos se exprimieron naranja agria (*Citrus aurantium*), naranja dulce (*Citrus sinensis*), toronja (*Citrus paradisi*) y limón (*Citrus limon*).

Técnica de difusión en agar:

Se prepararon suspensiones bacterianas en agar estándar a una concentración final de aproximadamente 10^5 UFC/ml. De estas suspensiones se agregaron volúmenes de 10 ml en placas de Petri. Posterior a la solidificación del medio se colocaron cilindros estériles de cerámica de 200 μ l de capacidad, separados equidistantemente, en los cuales se agregaron los extractos de cítricos preparados. Las placas se incubaron 24 hr a 37° C. Se definió como efecto inhibitorio, la ausencia de crecimiento bacteriano alrededor del cilindro formando un halo claro mayor o igual a 8 mm (Block, 1983).

Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana :

;

Se determinó el pH de los extractos de jugos de cítricos y se llevaron a un pH final de 7,0 con NaOH 1,0 M. Los extractos así tratados se utilizaron inmediatamente en la prueba de difusión. Como control se utilizó PBS, pH 7,0.

Separadamente, se ajustó el pH de los extractos a pH 2,0 o 3,0 con soluciones amortiguadoras de glicina-HCl para ser utilizados

inmediatamente en la prueba de difusión. Como controles se utilizaron las soluciones amortiguadoras de glicina-HCl.

Efecto de la materia orgánica y la temperatura sobre la actividad antimicrobiana del jugo de limón:

Como en los experimentos anteriores se obtuvo la mayor actividad antimicrobiana con jugo de limón, las pruebas siguientes se realizaron sólo con el mismo. Se agregó al extracto de jugo de limón un volumen de suero fetal bovino para obtener una concentración final de proteína del 1% y de este modo determinar si el efecto antimicrobiano del extracto se mantiene en presencia de materia orgánica. A esta mezcla se le agregó 1,0 ml de la suspensión bacteriana de *S. aureus* o *P. aeruginosa* y después de 5 min de contacto se hicieron diluciones seriadas y se realizó el recuento total aerobio para determinar la fracción de microorganismos supervivientes.

En otro experimento el extracto de jugo de limón se calentó a 40°, 60° y 80°C antes de ser utilizado en la prueba de difusión.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de jugo de limón sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus*:

Se realizaron diluciones seriadas dobles del jugo de limón para determinar la mayor dilución capaz de inhibir el crecimiento

bacteriano. Como diluyente se utilizaron 5 ml de CTS. Posteriormente los tubos se inocularon con 0,5 ml de un cultivo de 24 hr de *S. aureus* o *P. aeruginosa* en CTS. Después de 48 hr se determinó la presencia de crecimiento observando la turbidez del medio de cultivo. Se seleccionó la mayor dilución que inhibió completamente el crecimiento bacteriano como la CMI.

Separación de las fracciones del extracto de jugo de limón:

Se filtró el extracto de jugo de limón a través de una membrana de ultrafiltración Amikon, con un límite de exclusión de 30 000 Daltons y se realizó inmediatamente una prueba de difusión tanto con la fracción del extracto que pasó a través de la membrana (filtrado) como la fracción que no logro pasarla (retenido).

También se realizó una cromatografía utilizando una columna de Sephadex G-25 (5 x 0.75 cm, Pharmacia AB, Uppsala, Suecia) eluyendo las fracciones con PBS en una placa de microtitulación. A uno de cada cuatro pocillos se le determinó la presencia de proteínas agregando 50 *ul* de azul de Comassie (Bradford, 1975)

Determinación de la curva de titulación del jugo de limón :

A una muestra de jugo de limón se le midió el pH. Luego se agregaron alícuotas de 1.0 ml de NaOH 1.0 M y se midió el pH después de cada adición. Posteriormente se graficaron los volúmenes de NaOH agregados vs pH y se estimó la pKa del extracto por el método gráfico (Keenan *et al.*, 1986).

Determinación de los ácidos orgánicos volátiles y no volátiles del extracto de jugo de limón:

El análisis se realizó en el Laboratorio de Microbiología Básica de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (San José, Costa Rica) por medio de cromatografía de gases en la que se utilizó una columna CROM WAWBMCS 60/80 como fase sólida, FFAP 15% y H_2 para el arrastre.

RESULTADOS

Cuando se probó el efecto inhibitorio de los extractos de semillas y el zumo de toronja sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* y *S. aureus* se encontró que en ninguno de los casos estudiados hubo inhibición del crecimiento bacteriano ya que el mismo fue igual en todas las muestras y en los controles sin extracto.

Por otra parte todos los jugos produjeron inhibición de ambas especies de bacterias cuando el pH se redujo a 2,0 pero el efecto se perdió a pH igual o mayor a 3,0. En estos casos, el crecimiento bacteriano fue normal en los controles que contenían las soluciones amortiguadoras a pH de 2,0 o 3,0.

En el ensayo realizado con el jugo de limón en presencia de 1% de proteínas se encontró que aún bajo estas condiciones la población

bacteriana se redujo en al menos 5 logaritmos con respecto a la carga inicial. Este efecto fue el mismo tanto para el *S. aureus* como para *P. aeruginosa*. El mismo resultado se obtuvo en los controles sin proteína.

Al estudiar el efecto del calentamiento del jugo de limón sobre el crecimiento de las bacterias se encontró que el diámetro de los halos de inhibición fue el mismo en todos los casos (40°, 60°, 80°C) incluyendo al control sin calentar.

La concentración mínima inhibitoria del jugo de limón fue de 1:4 para *P. aeruginosa* y de 1:16 para *S. aureus*.

Por otra parte, al realizar ultrafiltración se determinó que el efecto antimicrobiano está presente en la fracción que pasa por la membrana de 30 000 Da de límite de exclusión.

Al realizar la filtración en Sephadex G-25 el efecto se detectó en la fracción # 12 que es la que al mismo tiempo mostró un contenido menor de proteínas.

La curva de titulación del jugo de limón mostró que la pKa calculada por el método gráfico es de 3,2. La cromatografía de gases mostró que el jugo tiene trazas de ácido acético, propiónico, isobutírico, valérico y butírico. No se detectaron ácidos orgánicos no volátiles metilados.

DISCUSION

Los cítricos han sido ampliamente utilizados tanto en aspectos de salud como por sus efectos antimicrobianos. En el sector salud se han utilizado en la prevención de litiasis de oxalato de calcio suministrando en la dieta un litro de jugo de naranja diario; se cree que mediante la eliminación de ácido cítrico en orina y el pH bajo se logró disminuir la formación y cristalización de los cálculos (Campoy *et al.*, 1994). También se han utilizado en la prevención del cáncer ya que se ha visto que tanto la naranja, la toronja y los jugos de remolacha inhiben *in vitro* la formación de una sustancia carcinogénica llamada N-nitrosodimetilamina a partir del jugo gástrico de pacientes enfermos (Ilnitskii, 1993).

El efecto antimicrobiano de ácidos orgánicos e inorgánicos ha sido ampliamente estudiado (Block, 1983). En nuestro país la utilización de jugos de cítricos ha tenido relevancia en la prevención de infecciones de origen alimentario (Mata, 1992; Rivera *et al.*, 1994). Se ha logrado determinar que el empleo del jugo de toronja en agua contaminada con *Vibrio cholerae* disminuye el crecimiento de la bacteria, lográndose disminuir el riesgo de contraer la enfermedad al utilizar este cítrico en la preparación de alimentos (Mojica *et al.*, 1994).

En el presente estudio, los extractos acuosos de semillas y del zumo de toronja no mostraron ningún efecto inhibitorio sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Sin embargo existe la posibilidad de que existan uno o varios agentes activos que no sean extractables en soluciones acuosas y que pasarían desapercibidos con el procedimiento

utilizado. En otro estudio, resultados preliminares con extractos de semillas de naranja (*Citrus sinensis*) utilizando solventes orgánicos para la extracción se ha obtenido un efecto muy leve sobre las mismas bacterias cuando se utilizan solventes más polares como metanol y acetona, pero no cuando se utiliza éter de petróleo (Elizabeth Arias Escuela de Tecnología de Alimentos, Costa Rica, comunicación personal).

Por el contrario, los jugos obtenidos de los cítricos sí inhiben el crecimiento bacteriano. En el caso del jugo de limón en concentraciones de 1:4 para *P. aeruginosa* y de 1:16 para *S. aureus*. Sin embargo este efecto es dependiente del pH ya que a pH mayores de 3.0 el efecto desaparece. Esto coincide con la pKa determinada gráficamente para el extracto de jugo de limón (3,20).

A pH mayores de 3,20 se favorece la forma disociada de los ácidos presentes en una proporción mayor al 50%, lo cual, podría provocar que no se tenga la actividad antimicrobiana esperada ya que la mayoría de los ácidos orgánicos que manifiestan dicha actividad la presentan en su forma no disociada (Block, 1983). Por otra parte el efecto antimicrobiano de los extractos de jugos de cítricos no es causado simplemente por la reducción en el pH ya que las soluciones amortiguadoras de glicina-HCl empleadas como controles no tuvieron ningún efecto sobre los microorganismos utilizados.

En las separaciones hechas al jugo de limón tanto por ultrafiltración como con la filtración en gel se logró determinar que este contiene componentes inhibitorios para los microorganismos con peso molecular menor de 30 000 Daltons y que no contienen un alto porcentaje proteico. Por otro lado estos componentes inhibitorios son

estables al calor pues conservan su efecto aún después del calentamiento a 60 °C.

En conjunto estos resultados sugieren que él o los agentes activos contra los microorganismos estudiados se asemejan en su comportamiento a los ácidos orgánicos de bajo peso molecular que se utilizan con frecuencia para la preservación de alimentos.

Al mismo tiempo se concluye que las variaciones en el pH que puedan inducir los alimentos sobre el jugo de los cítricos podría influir de manera importante sobre el efecto antimicrobiano, el cual, desaparece al aumentar el pH por encima de 3.0.

Es deseable destacar la importancia de no haber encontrado efecto inhibitorio sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus* al utilizar extractos de semillas de cítricos ya que muchas casas comerciales distribuidoras de desinfectantes de tipo orgánico dicen usar estos extractos como agente activo. De tal modo que se debería ahondar más en el estudio de cual es la composición de estos productos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente el apoyo del Dr. José Antonio Gené, quién ha sido mi maestro y guía durante la realización de esta investigación. Sin él hubiese sido imposible la culminación del mismo.

También quisiera agradecer al Sr. Pablo Vargas D. por el análisis de ácidos orgánicos volátiles y no volátiles.

Personas que no han tomado parte en la elaboración práctica o teórica de este trabajo pero que siempre han sido para mí ejemplo de esfuerzo y superación son mis padres, a quienes agradezco todas las oportunidades que me han brindado.

RESUMEN

Se realizaron análisis de diferentes extractos de cítricos para determinar su efecto inhibitorio sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Los extractos acuosos de semillas de cítricos así como el zumo de toronja no mostraron ningún efecto sobre los microorganismos antes mencionados. Por el contrario los extractos de jugos de cítricos si muestran un efecto antimicrobiano, siendo mayor en el jugo de limón. El efecto es dependiente, pero no causado por, el cambio en el pH; es estable a una temperatura de 80°C y se mantiene en presencia de materia orgánica.

REFERENCIAS

- Block, 1983. Desinfection and Preservatives. Mc Graw Hill, México. 400-404 p.
- Campoy *et al.*, 1994. Orange juice in the prevention of calcium oxalate lithiasis. Rev. Actas-Urol-Esp.18:738-443.
- González,AG. 1994. Screening of antimicrobial and cytotoxic activities of Panamanian plants. Rev. Phytomedicine.1:149-152.
- Ilnitskii,AP. 1993. Effect of fruit and vegetable juices on the changes in the production of carcinogenic N-nitroso compounds in human gastric juice. Rev. Vopr-Pitan.4:44-46.
- Keenan, Ch. 1986. Química General Universitaria. Compañía Editorial Continental, México. p 250-260.
- Kenawi,MA. 1994. The storage effects of calcium fortified orange juice concentrate in different packaging materials. Rev. Plant-Foods Hum-Nutr.45:265-275.
- Kuttan, G. 1993. Tumoricidal activity of mouse macrophages treated with *Viscum album* extract. Rev Immunol-Invest.22:431-440.
- Licastro, F. 1993. Lectins and superantigens: membrane interaction of these compounds with T lymphocytes affect immune responses. Rev Int-J-Biochem.25:845-852.
- Mata, L. 1992. El cólera, prevención y control. EUNED-EUCR. 366 p.
- Morín, Ch. 1980. Cultivo de Cítricos. Editorial IICA, San José 50-65 p.
- Mujica,OJ: 1994. Epidemic cholerae in the Amazon: the role of production in disease risk and prevention. Rev.J-Infect-Dis.169:1381-1384.
- Rivera, *et al.* 1994. Susceptibility of the bacterium *V cholerae* to acid pH in salad vegetables: An ultrastructural view. Rev. Biol. Trop.42:97-102.
- Stange,RR. 1993. An antifungal compound produced by grapefruit and Valencia orange after wounding of the peel. Rev. J-Nat-Prod. 56 1627-1629.
- Ulgen, N. 1993. Determination of optimum pH and temperature for pasteurization of citrus juices by response surface methodology. Rev. Z-Lebensm-Unters-Forsch.196:45-48.

Unsworth, DJ. 1993. Extracts of wheat gluten activate complement via the alternative pathway. Rev Clin-Exp-Immunol.94:539-543.

Vandamme,EJ: 1994. Novel microbial pharmaco and agroactive compounds. Rev. Agro-Food-Industry-Hi-Tech. 19:17-22.

Yamada,T.1991. Determination of thiabendazole (TBZ) in grapefruit. Rev. Eisei-shikenjo-Hokoku.109:100-105.

ANEXO

DETERMINACION pKa DEL
JUGO DE LIMON CON NaOH

