

EFFECTO INHIBITORIO DE BACTERIAS PATÓGENAS CON EXTRACTOS DE XOCONOSTLE ASISTIDOS POR ULTRASONIDO

Roldán Cruz C. A., Ángeles Santos A., Hernández Fuentes A. D., Santos Fernández S.A., Campos Montiel R. G.*

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Av. Rancho Universitario Km. 1, C.P. 43600, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.

carc7_335@hotmail.com

RESUMEN

En el presente trabajo se investigó los efectos de la extracción con ultrasonido de los compuestos bioactivos de xoconostle con actividad inhibitoria de bacterias patógenas (*Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*). Las condiciones de la extracción fueron: tiempo 10 minutos; concentración de metanol 80%; relación g/mL 1/10. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre todos los tratamientos (0, 10, 20, 30, 62.5, 125 y 150 mg de extracto de xoconostle obtenido mediante ultrasonido). En *Escherichia coli* se observó la menor inhibición. En *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todos los tratamientos, encontrando en estas tres bacterias mayor inhibición con los extractos de xoconostle obtenidos por ultrasonido.

ABSTRACT

In this paper were researched the effects of ultrasound extraction of bioactive compounds of xoconostle with inhibitory activity of pathogenic bacteria (*Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*). The extraction conditions were: time 10 minutes; methanol concentration of 80%; ratio g/mL 1/10. Significant differences ($p < 0.05$) among all treatments (0, 10, 20, 30, 62.5, 125 and 150 mg of extract obtained by ultrasound xoconostle were found). The less inhibition was observed in *Escherichia coli*. In *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* significant differences ($p < 0.05$) among all treatments, finding in these three bacteria with greater inhibition with xoconostle extracts obtained by ultrasound.

Palabras clave: Compuestos bioactivos, Gram positivas y Gram negativas

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

El xoconostle (*Opuntia joconostle* Web.), es una cactácea resistente a la sequía que contiene polifenoles solubles. Estos compuestos orgánicos presentan efecto antibacteriano, anticancerígeno, anti-inflamatorio, antioxidante y propiedades antivirales (Corrales *et al.*, 2008). Lo podemos encontrar silvestre en varios

lugares del altiplano mexicano y cultivado en los estados de Jalisco, Querétaro, Michoacán, Estado de México e Hidalgo (Filardo et al., 2001).

El efecto antimicrobiano de las frutas ha sido asociado con el contenido de compuestos fenólicos, los cuales constituyen un grupo diverso en el xoconostle, incluyendo taninos, ácidos fenólicos de bajo peso molecular, flavonoides, antocianinas, por mencionar algunos (Osorio *et al.*, 2011). Cuatro diferentes especies fueron usadas para probar la posible actividad antimicrobiana de los extractos de xoconostle, de las especies usadas *Staphylococcus aureus* es una de las bacterias Gram-positivas más comunes que causan intoxicación alimentaria. No se encuentran en los alimentos, pero al ser procesados por los humanos, éstos son contaminados. *Listeria monocytogenes* otra bacteria Gram-positiva, es un patógeno que puede causar listeriosis, con síntomas tales como vómitos, náuseas y diarrea. La infección puede conducir a septicemia, meningitis, encefalitis, e infecciones intrauterinas o cervicales en las mujeres embarazadas, lo que puede resultar en aborto o mortinato (Rocourt *et al.*, 2003). En 1999, un brote de listeriosis se tradujo en 97 casos de enfermedad, 6 aborto involuntario, y 14 muertes (Song and Yang, 2010).

Las bacterias Gram-negativas son representadas por *Escherichia coli*, la cual pertenece a la flora natural de los humanos. Sin embargo una cepa de *E.coli* ha causado serios casos de envenenamiento por alimentos y compuestos antimicrobianos para eliminar este crecimiento son necesarios (Rauha *et al.*, 2000). También se utilizará *Salmonella spp.* el cual es otro patógeno alimentario común e importante que puede causar fiebre, diarrea, vómitos, y dolor abdominal. Los síntomas suelen ser leves, sin embargo, en niños pequeños, personas débiles o pacientes de edad avanzada, los síntomas pueden dar lugar a complicaciones potencialmente mortales (Srikanth and Cherayil, 2007).

El uso de tecnologías emergentes como nuevas técnicas de extracción, ha venido a beneficiar la cantidad extraída de compuestos bioactivos, los tiempos de extracción han disminuido en comparación con extracciones convencionales. Una de estas tecnologías es la extracción asistida por ultrasonido, donde una fuente vibrante (transductor) produce una onda ultrasónica (Raso *et al.*, 1999). El movimiento de vibración de dicho cuerpo se comunica a las partículas del medio que le rodean, las cuales comienzan a oscilar, comunicando la energía de forma también oscilante a las partículas vecinas (Mason *et al.*, 1996). De esta forma, se generan ciclos de alta y baja presión, lo que da origen al fenómeno de cavitación, donde las burbujas en la extracción sólido/líquido pueden colapsar explosivamente y generar altas temperaturas y presiones, que causan la ruptura de tejidos vegetales y mejora la liberación de sustancias intracelulares en el disolvente, incrementando así la transferencia de masa (Knorr *et al.*, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los extractos asistidos con ultrasonido

Los xoconostles se seleccionaron por madurez fisiológica, se cortaron en rodajas y se metieron a liofilizar por 3 días. Después este tiempo el xoconostle se trituro y fue pasado por un tamiz del número 100. El polvo obtenido se colocó en un vaso de plástico y se sometió a la extracción asistida por ultrasonido, con un procesador ultrasónico modelo VCX 130 (Sonics Vibracell, USA) con un poder ultrasónico de 130 W y 20 KHz, a temperatura ambiente y bajo las siguientes condiciones: concentración de metanol 80%; tiempo en minutos 10; relación peso del xoconostle en gramos de polvo/mL de metanol 1/10.

El extracto obtenido por ultrasonido se concentró en un rotavapor BÜCHI R-210/215, hasta separar la mayor cantidad de solvente, después se liofilizaron dichas muestras, para tener los extractos secos.

Activación de las cepas.

Las sepas proporcionadas por la Universidad Autónoma de Querétaro, que se encontraban en congelación (-10°C) en una mezcla 50:50 glicerol-caldo nutritivo, fueron activadas agregando 1mL de la bacteria a un frasco que contenía 99mL de caldo nutritivo estéril. Este caldo fue incubado 36±1°C, para *Escherichia coli* se dejó incubar por 5 horas, en cuanto *Salmonella spp.* el tiempo de incubación fue de 22.5 horas, referente a *Staphylococcus aureus* se incubó por 9 horas y *L. monocytogenes* se dejó en un lapso de 24-37 horas. En todos los casos fue hasta obtener una densidad bacteriana de 10⁶-10⁸ UFC/mL.

Método de microdilución en caldo.

La metodología que se siguió fue de acuerdo a Klancnik (2010), con algunas modificaciones. Dicha metodología se describe a continuación:

Se prepararon los medios de cultivo específicos con agar eosina y azul de metileno para *Escherichia coli* O157:H7, agar *Salmonella-Shigella* para *Salmonella spp.*, para *Staphylococcus aureus* se usó agar para *Staphylococcus* y para *Listeria monocytogenes* agar nutritivo (todos los agares usados fueron de la marca Bioxon) llevándose a cajas petri de 6 cm de diámetro. Las cajas se dejaron solidificar a temperatura ambiente (20°C). Se probaron las concentraciones 0, 10, 20, 30, 62.5, 125 y 150 mg de extracto obtenido por ultrasonido. Un vez que se activó cada bacteria hasta obtener una densidad microbiana de aproximadamente, 10⁶-10⁸ UFC/mL en caldo nutritivo, se realizó una dilución 1:10, agregando en un frasco estéril un mililitro de bacteria más nueve mililitros de la solución de extractos de xoconostle y solución salina, esto se agitó durante diez minutos. Después de ese tiempo se hicieron las diluciones microbiológicas necesarias y se inoculó (25µL) en los respectivos agares para cada bacteria. La incubación se llevó a cabo en una estufa a 37°C en un lapso de tiempo de 18-24 horas y posteriormente se hizo el conteo en placa. El control positivo fue una solución salina y como control negativo agua.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar. Cuando se encontraron diferencias significativas (p<0.05), se utilizó la técnica de Tukey para comparación de medias. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1, se muestra el comportamiento de *Salmonella spp.* frente a las diferentes concentraciones del extracto de xoconostle asistido con ultrasonido, los resultados expresan que existe diferencias significativas ($p < 0.05$) para todos los tratamientos. Encontrando un efecto inhibitorio significativo ($p < 0.05$) desde los 10 mg. Côté (2011) encontró una fuerte inhibición de *Salmonella typhimurium* cuando probó los extractos no polares de arándano.

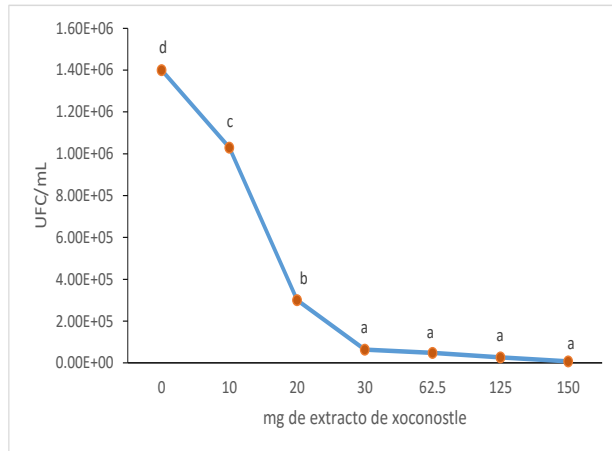


Figura 1.- Comportamiento de *Salmonella spp.* frente a diferentes concentraciones de extracto obtenido mediante ultrasonido.

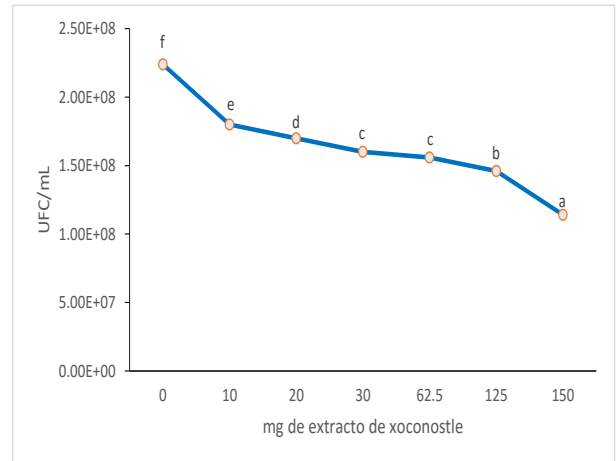


Figura 2.- Comportamiento de *Escherichia coli* O157:H7 frente a diferentes concentraciones de extracto obtenido mediante ultrasonido.

La figura 2 indica que *Escherichia coli* O157:H7, es poco inhibida por el extracto obtenido mediante ultrasonido, este efecto inhibitorio se encuentra desde los 10 mg, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todos los tratamientos. Resultados similares muestra Rauha (2000), donde al probar la inhibición de extractos fenólicos de 29 plantas frente a *Escherichia coli*, encontró un efecto muy pequeño con algunos extractos y nulo con otros.

Es posible observar en la figura 3, que *Listeria monocytogenes* fue inhibida considerablemente por los extractos de xoconostle obtenidos mediante ultrasonido, existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todos los tratamientos y encontrando la mayor inhibición a los 150 mg. Estos resultados se asemejan con los que reporta Côté (2011), donde se prueba el efecto antimicrobiano de jugo de arándano y sus extractos, encontrando que *Listeria monocytogenes* es fuerte inhibida.

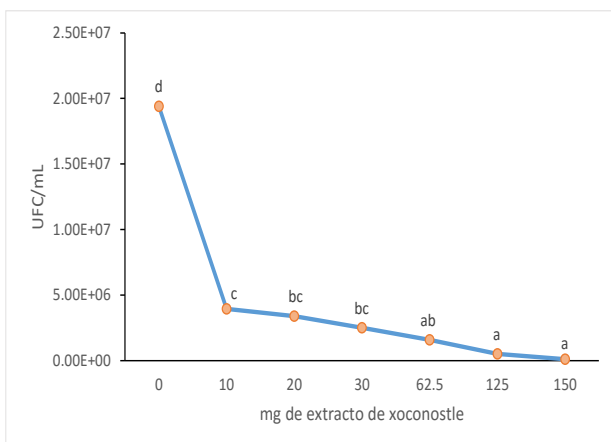


Figura 3.- Comportamiento de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes concentraciones de extracto obtenido mediante ultrasonido.

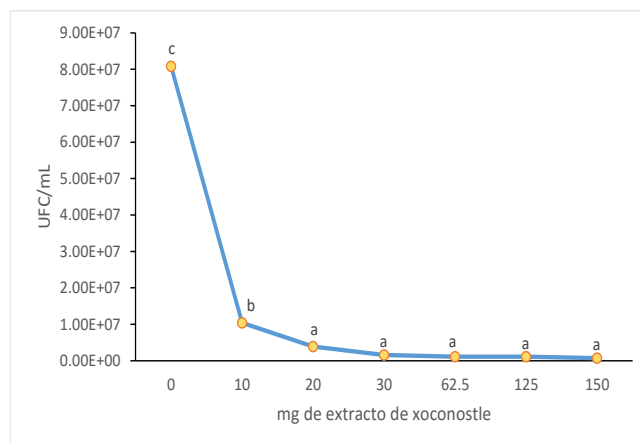


Figura 4.- Comportamiento de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes concentraciones de extracto obtenido mediante ultrasonido.

La figura 4, se puede el comportamiento de *Staphylococcus aureus* frente a las diferentes concentraciones del extracto de xoconostle hecho con ultrasonido, los resultados muestran diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los tratamientos con 0, 10 y 20 mg, más no fue así entre los tratamientos con 20, 30, 62.5, 125 y 150 mg de extracto de xoconostle obtenido por ultrasonido. Los resultados obtenidos en esta investigación son semejantes a los obtenidos por Stanisavljević (2009), donde los compuestos que son extraídos por ultrasonido de *Echinacea purpurea* L. fueron probados en la inhibición de *Staphylococcus aureus*, encontrando una zona de inhibición de 11.0 mm, siendo está mayor al control presentado.

CONCLUSIONES

El extracto de xoconostle inhibió a todas las bacterias patógenas del estudio y su efecto no tiene correlación con el Gram de las bacterias.

Los resultados sugieren que en la extracción asistida por ultrasonido es posible obtener compuestos bioactivos que inhiben a *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Corrales M, Toepfl S, Butz P, Knorr D, Tauscher B. 2008. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9:85-91.
2. Côté J, Caillet S, Doyon G, Dussault D, Sylvain JF, Lacroix M. 2011. Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts. *Food Control* 22:1413-1418
3. Filardo K, Sheinvar L, Bye R, González L, Pérez A, Mendoza M, Hidalgo M, Juárez J. 2001. Producción y comercialización de frutos comestibles de *Opuntia spp.* en el Valle del Mezquital, Cactáceas y Suculentas Mexicanas 1.

4. Klancnik A, Piskernik S, Jersek B, Mozina S S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extract. *Journal of Microbiological Methods* 121-126.
5. Knorr D, Ade-Omowaye BIO, & Heinz V. 2002. Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing. *Proceedings of the Nutrition Society* 22:311-318.
6. Mason TJ, Paniwnyk L, Lorimer JP. 1996. The use of ultrasound in food Technology. *Ultrasonics Sonochemistry* 3:253-256.
7. Osorio Esquivel O, Ortiz Moreno A, Álvarez V, Dorantes Álvarez L, & Giusti M. 2011. Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Research International* 44:2160-2168.
8. Raso J, Mañas P, Pagán R, Sala FJ. 1999. Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry* 5:157-162.
9. Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Internacional Journal of Food Microbiology* 56:3-12.
10. Rocourt J, Ben-Embarek P, Toyofuku H, & Schlundt J. 2003. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 35:263-267.
11. Song AL and Yang ZG. 2010. Curious *Listeria monocytogenes*. *Journal of Aerospace Medical* 21:364.
12. Srikanth CV and Cherayil BJ. 2007. Intestinal innate immunity and the pathogenesis of *Salmonella enteritis*. *Immunologic Research* 37:61-78.