

Caracterización biológica de aceites esenciales de toronja y limón y sus fracciones concentradas

Sofía Placencia, Sandra Castillo, Cynthia Torres-Álvarez, Mayra Treviño
Claudia Gallardo, Juan Gabriel Báez*

Departamento de Ciencia de Alimentos, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

[*baezjuan@yahoo.com.mx](mailto:baezjuan@yahoo.com.mx)

RESUMEN: En esta investigación se evaluaron las propiedades antimicrobianas y antioxidantes aceites esenciales de toronja y limón y sus aceites concentrados (folded oils) obtenidos mediante cold press. La actividad antimicrobiana se determinó en bacterias de importancia en alimentos: *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*, mediante pruebas preliminares de difusión en papel y posteriormente la concentración mínima bactericida (CMB) por el método de microdilución. La actividad antioxidante fue determinada por el método de ABTS y DPPH. En general, los resultados mostraron una actividad antimicrobiana mayor para los aceites concentrados, con CMB en rangos de 1.8 a 15.5 mg/mL, siendo menores que aquellas CMB determinadas para los aceites no concentrados que resultaron >13.5 mg/mL. El aceite concentrado de limón (5x) resultó más efectivo que el de toronja contra las tres cepas. En el caso de la actividad antioxidante fue más alta en los aceites concentrados teniendo un IC50 para el limón (5x) de 570.23 y 8060.21 mg/L, mientras que en el aceite de toronja (10x) fue de 673.53 y 7675.14 mg/L para ABTS y DPPH respectivamente.

En general, los aceites concentrados mostraron mayores propiedades biológicas que los aceites tradicionales.

Palabras clave: Aceites esenciales cítricos, antimicrobiano, antioxidante.

ABSTRACT: In this research the antimicrobial and antioxidant properties of grapefruit and lemon essential oils and their folded oils obtained by cold press were evaluated. The antimicrobial activity was determined in foodborne pathogens: *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi*, by preliminary tests of diffusion on paper and subsequently the minimum bactericidal concentration (CMB) by the microdilution method. The antioxidant activity was determined by the ABTS and DPPH method. In general, the results showed a higher antimicrobial activity for concentrated oils, with CMB ranging from 1.8 to 15.5 mg / mL, being lower than those CMB determined for non-concentrated oils that resulted >13.5 mg / mL. Lemon folded oil (5x) was more effective than grapefruit folded oil (10x) against all the strains. In the case of antioxidant activity, it was higher in concentrated oils having an IC50 for lemon folded oil (5x) of 570.23 and 8060.21 mg / L, while in grapefruit folded oil (10x) it was 673.53 and 7675.14 mg / L for ABTS and DPPH respectively. In general, concentrated oils showed greater biological properties than traditional oils.

Keywords: Antibacterial, antioxidant, citric essential oils.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el uso de productos naturales ha ganado popularidad debido al interés que se ha generado en la sociedad por remplazar los productos químicos contenidos en fármacos y aditivos alimentarios, esto debido al daño que éstos últimos causan tanto en el medio ambiente como en la salud de las personas. A partir de esta necesidad se han desarrollado productos elaborados con aceites esenciales los cuales se han introducido en el mercado gracias a sus propiedades tanto farmacológicas como antimicrobianas (Turek & Stintzing, 2013). Además de que han sido clasificados como sustancias GRAS (Generally Recognized as Safe) por lo que su uso en alimentos como sustitutos de conservadores, ha ido en aumento (FDA).

Se puede definir a los aceites esenciales como sustancias orgánicas volátiles, obtenidos de los metabolitos secundarios de plantas, que además de ser compuestos etéreos y volátiles a temperatura ambiente, no suelen tener una coloración y son los responsables del olor de las plantas (Universidad Politécnica de Madrid, 1998). La mayoría de ellos son solubles en soluciones orgánicas y estos cuentan

con una menor densidad que el agua (Palazzolo, Armando Laudicina, & Antonietta Germanà, 2013), además de que se caracterizan generalmente por tener un fuerte olor al ser extraídos (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008). Existen diferentes tipos de aceites esenciales y estos varían en su composición química, dependiendo de varios factores, entre los cuales destaca el tipo extracción, que puede llevarse a cabo a partir de materia vegetal mediante procedimientos mecánicos, como destilación seca, al vacío o cold pressing entre otros (Masayoshi Sawamura et al., 2001). La técnica de cold pressing puede llevarse a cabo por los métodos de Brown y FMC (Food Machinery Company). El método Brown consiste en la obtención del aceite antes de la extracción del jugo mientras que la FMC se logra la obtención del aceite al mismo tiempo que el jugo. En ambas tecnologías el sistema de prensado es en frío, donde se logra tomar el aceite expulsado de la cascara y este se envía por agua formándose una emulsión la cual pasa por un filtro y es concertada mediante centrifugación (García, 2010). Otros factores que afectan la composición química de los mismos son: la época de recolección, la edad de la planta o el lugar donde fue recolectado. Dentro de la composición química, existen compuestos no deseados como los terpenos hidrocarbonados que pueden ser removidos durante el procedimiento de extracción dando lugar a aceites concentrados (2.5x, 5x, 10x, 20x) los cuales difieren en su composición, adquiriendo propiedades diferentes a las del aceite original (Torres *et al.*, 2016). Por lo general los aceites esenciales de cítricos son inestables una vez expuestos a la luz, por esta razón se realiza la eliminación de este tipo de compuestos dando como resultado fracciones oxigenadas en las cuales se ha observado una mayor actividad biológica comparada con el aceite original. Aunque se ha comprobado la actividad antimicrobiana de aceites esenciales, contra microorganismos de importancia en la industria de los alimentos (Lemes *et al.*, 2018), es importante caracterizar las propiedades biológicas de los aceites concentrados, debido a las diferencias importantes en su composición. En este trabajo se pretende comparar la actividad biológica (antimicrobiana y antioxidante) de los aceites de cítricos limón y toronja obtenidos por cold pressing y sus concentrados (5x, 10x), para determinar si existe un aumento en la actividad en aquellos aceites concentrados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. **Obtención de los aceites.** Los aceites utilizados en este estudio fueron de limón y toronja, obtenidos industrialmente por cold press (prensado en frío). Se obtuvieron fracciones concentradas, conocidas como “folded oil” (FO) de 5x y 10x respectivamente. Estos fueron donados por Frutech International (N.L., México); Los FO fueron preparados a partir de los aceites esenciales en una columna de destilación al vacío con una estructura envoltoria teóricamente equivalente a 20 platos. Las condiciones de los parámetros usados mediante la destilación al vacío fueron ajustadas basadas en la composición inicial de los “cold press” para la obtención de un producto final con la composición deseada.
2. **Cepas microbianas y condiciones de cultivo.** Las cepas que se utilizaron fueron *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Salmonella typhi* ATCC 19430. Donadas por el laboratorio de Alimentos Funcionales de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. Se cultivaron en agar Infusión Cerebro Corazón (ICC) estéril (121 °C /15min) (Difco, DB Sparks MD, USA). Con temperaturas de cultivo de 37±2 °C / 24h. para *Staphylococcus aureus* y *Salmonella*, y 30±2 °C / 24h para *Listeria innocua*, en atmósferas aerobias.
3. **Ensayos preliminares de actividad antimicrobiana.** Para evaluar en forma preliminar el efecto antimicrobiano de los extractos de cítricos obtenidos, se utilizó el método de difusión de papel en agar (Torres-Alvarez *et al.*, 2016), el cual consistió en inocular 100 µl de la cepa activada (24h), sobre placas Petri con agar Mueller Hinton (MH). Después de sembrar por extensión con un asa de Driglasky, se colocaron discos de papel de 6mm con 50 µl de aceite esencial (50% v/v en Dimetil sulfóxido, DMSO) sobre agar; como controles se utilizaron discos con DMSO estéril. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h. Para *Listeria innocua*, se procedió de la misma manera arriba mencionada, pero se utilizó agar soya tripticasa (TSA) en lugar de MH. El efecto del extracto se

determinó mediante la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del papel del cual se midió su diámetro en centímetros.

4. **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMB).** Para determinar la CMB, se utilizó el método propuesto por Sánchez *et al.*, (2016) con algunas modificaciones. Microplacas de 96 pozos conteniendo 150uL de caldo MH estéril, fueron adicionados con 50uL de aceite (50% en DMSO v/v) y se realizaron diluciones seriadas. Posteriormente se le agregó a cada pozo 1% de cultivo activado y ajustado a una concentración aproximada de $5-7 \times 10^6$ células/mL (OD_{600} 0.2). Los tubos se incubaron a 37°C/24h en condiciones aerobias. Trascorrido este tiempo, se tomaron 20 µl de cada cultivo y se realizó una siembra por goteo en placas de agar MH, según el método mencionado por Torres-Álvarez, 2016. Las placas se incubaron en las mismas condiciones arriba mencionadas. Pasado el tiempo de incubación se determinó la CMB la cual se definió como la concentración más baja del extracto que inhibió completamente el crecimiento microbiano. Para *Listeria innocua*, se procedió de la misma manera arriba mencionada, pero se utilizó TSA en lugar de MH.
5. **Capacidad antioxidante.** La actividad Antioxidante fue determinada mediante dos métodos, utilizando el método de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•). La Técnica de DPPH• se realizó de acuerdo con el método mencionado por Castillo *et al.*, (2017), con algunas modificaciones. Una solución stock de DPPH se preparó mezclando 3.9 mg con 100mL de etanol absoluto y ajustada a A517 nm de 0.7 ± 0.02 . Alícuotas de 2.25 mL de DPPH se colocaron en tubos y fueron sometidas a agitación, con cantidades de (600-200 µL) de cada extracto. Estas se mantuvieron en la oscuridad por 30 min. Pasado este tiempo se midió la absorbancia a 517nm. Utilizando el método de ABTS•+ (2,2'-azino-bis [3-ethylbenzothiazoline-6- sulphonic acid]), este método fue elaborado de acuerdo con Re. et al. (1999) con algunas modificaciones, el ABTS fue preparado por la reacción de una solución stock (7mmol) con persulfato de potasio (2.45 mmol), dejando la mezcla a temperatura ambiente y en oscuridad por 16 horas. La solución fue diluida con etanol hasta obtener una coloración de 0.700 ± 0.02 at 734 nm.

La actividad antioxidante fue calculada como porcentaje de inhibición de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{Inhibicion} = (Ab - As) / (Ab \times 100)$$

Donde Ab representa la absorbancia del blanco y As es el aceite para probar, en adición la actividad antioxidante expresada como la mitad de la concentración máxima inhibitoria IC_{50} (mg/L) fue definida como la cantidad de antioxidante necesaria para bajar la concentración inicial de ABTS y DPPH en el 50%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **tabla I**, se muestra la actividad antimicrobiana preliminar contra las tres bacterias probadas, con halos de inhibición en rangos de 0.5 a 2.6 cm, siendo el limón persa concentrado, el que mostró en general una mayor actividad antimicrobiana preliminar. Al determinar la CMB, se evidenció una actividad mayor en aquellos aceites concentrados (limón 5x, toronja 10x) comparados con los tradicionales (limón, toronja). Esto coincide con los resultados presentados por (Torres-Alvarez *et al.*, 2016) quienes mencionan que los FO muestran mayor actividad que los aceites tradicionales contra bacterias de importancia en alimentos. Las CMBs determinadas fluctuaron desde 1.8 hasta 15mg/mL (tabla 2). Los resultados de CMB variaron entre las bacterias, siendo el FO de toronja más efectivo contra *L. innocua* (8mg/mL), mientras que el FO de limón, más efectivo para *S. typhi* (5.5 mg/mL) y *S. aureus* (1.8 mg/mL). Estas diferencias en las respuestas bacterianas pueden estar influenciadas por el tipo de pared celular y características fisiológicas, que varían dependiendo de cada tipo microorganismo (Nazzaro *et al.*, 2013). A pesar de que esta actividad antimicrobiana se les atribuye principalmente a los monoterpenos oxigenados, existen otro tipo de compuestos, que pueden

actuar sinérgicamente para aumentar la actividad antimicrobiana (Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., & Pagán, 2011).

Tabla I. Actividad antimicrobiana preliminar por difusión en papel.

Aceite esencial	Zona de Inibición (cm)		
	<i>L. innocua</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>
Limón persa	1.4	0.8	1.2
Limón 5x	2.6	0.5	1.4
Toronja	0.5	0.8	1
Toronja 10 x	2	0.8	0.8

En un trabajo realizado por Torres-Álvarez *et al.*, 2016, se determinó el perfil químico de los FO contra los tradicionales, dejando claro que la mayoría de los compuestos volátiles disminuyen su concentración, mientras que algunos compuestos como los monoterpenos oxigenados la aumentan. Esto tiene influencia directa sobre la actividad biológica, pues los compuestos remanentes al encontrarse en mayor cantidad actúan con mayor fuerza.

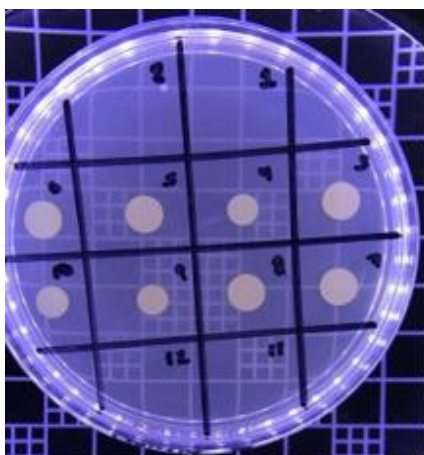


Figura 1. Respuesta de la Concentración Mínima Bactericida de *Staphylococcus aureus* en Mueller-Hinton, donde el 1 es la mayor concentración y 10 es la menor, mientras que 11 y 12 son controles

Tabla II. Concentración Mínima Bactericida de los aceites esenciales obtenidos por cold press.

Aceite esencial	Concentración Mínima Bactericida (mg/mL)		
	<i>L. innocua</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>
Limón persa	13.5±2 ^a	>13.5	>13.5
Limón 5x	13.5 ^a	5.5±1.1 ^b	1.8±0.5 ^b
Toronja	12.3± ^b	>15.5	>15.5
Toronja 10 x	8.0±1 ^c	15±2 ^a	15±2 ^a

Valores± desviación estándar. Estudio realizado por duplicado al menos tres repeticiones.

Estadístico ANOVA con post hook Tukey HSD.

Se ha comprobado que la actividad antioxidante varía de acuerdo la composición química de cada aceite esencial, se ha mencionado también que la actividad antioxidante de los mismos podría estar influenciada por la presencia del limoneno o incluso por el aumento de otros componentes y la eliminación de aquellos volátiles, además de una posible sinergia entre los compuestos remanentes (Boudries *et al.*, 2017).

Tabla III. Capacidad antioxidante. (IC₅₀)

aceite	Concentración Inhibitoria (IC ₅₀) (mg/L)	
	ABTS	DPPH
Limón	973.75	2685.83
Limón 5X	570.23	8060.21
Toronja	12207.21	608.42
Toronja 10 x	673.53	7675.14

Al realizar la prueba de capacidad antioxidante mediante los métodos ABTS Y DPPH se observó que el aceite de limón presentó la mayor actividad antioxidante con IC₅₀ de

973.7 y 2685.83 comparado con el de toronja que resultó en 12207.21 y 608.42 mg/L para ABTS y DPPH respectivamente (Tabla 3). Los FO resultaron con mayor capacidad antioxidante que sus respectivos aceites tradicionales siendo el FO de limón el que presentó la mayor actividad biológica (Tabla 3). Esto podría ser atribuido al tipo y cantidad de compuestos presentes en cada uno de los

aceites, ya que su composición puede variar de acuerdo al método de extracción utilizado (Boudries et al., 2017; Nazzaro *et al.*, 2013). En general los FO mostraron mejor actividad biológica, sin embargo es importante la determinación de los perfiles químicos de los aceites, para el estudio de los compuestos responsables de la actividad biológica. Investigaciones futuras deben dirigirse hacia la correlación de los compuestos presentes con la actividad biológica y su uso potencial como conservadores de alimentos.

BIBLIOGRAFIA

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008, February). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 46, pp. 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Boudries, H., Loupassaki, S., Ladjal Ettoumi, Y., Souagui, S., Bachir Bey, M., Nabet, N., ... Chibane, M. (2017). Chemical profile, antimicrobial and antioxidant activities of Citrus reticulata and Citrus clementina (L.) essential oils. *International Food Research Journal*, 24(4), 1782–1792.
- Castillo, S., Dávila-Aviña, J., Heredia, N., & Garcia, S. (2017). Antioxidant activity and influence of Citrus byproduct extracts on adherence and invasion of Campylobacter jejuni and on the relative expression of cadF and ciaB. *Food Science and Biotechnology*, 26(2), 453–459. doi:10.1007/s10068-017-0062-x
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., & Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22, 896–902.
- García, S. (2010). *Caracterización Fisicoquímica De Aceite Esencial De Limon De Tucuman*. 1–9. Retrieved from <http://scait.ct.unt.edu.ar/pubjornadas2010/trabajos/199.pdf>
- Lemes, R. S., Alves, C. C. F., Estevam, E. B. B., Santiago, M. B., Martins, C. H. G., Dos Santos, T. C. L., ... Miranda, M. L. D. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Citrus aurantifolia leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 90(2), 1285–1292. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170847>
- Nazzaro, F.; Fratianni, F.; De Martino, L.; Coppola, R.; De Feo, V. Effect of essential oils on 551 pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 2013, 6(12), 1451–1474.
- Palazzolo, E., Armando Laudicina, V., & Antonietta Germanà, M. (2013). Current and Potential Use of Citrus Essential Oils. *Current Organic Chemistry*, 17(24), 3042–3049. <https://doi.org/10.2174/13852728113179990122>
- Sánchez, E., Morales, C. R., Castillo, S., Leos-rivas, C., Misael, D., & Martínez, O. (2016). Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against Nosocomial Microorganisms, 2016.
- Sawamura, M., Son, U., Choi, H., Lee Kim, M., Thi Lan Phi, N., Fears, M., & KUMAGAI Sawamura, C. M. (n.d.). *COMPOSITIONAL CHANGES IN COMMERCIAL LEMON ESSENTIAL OIL FOR AROMATHERAPY*.
- Torres-Alvarez, C., Núñez González, A., Rodríguez, J., Castillo, S., Leos-Rivas, C., & Báez-González, J. G. (2016). Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils. *CyTA - Journal of Food*, 00(00), 1–7. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1220021>
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40–53. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>