

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**Evaluación Antibacteriana y Antioxidante de Extractos de la Cáscara de
naranja (*Citrus sinensis*) variedad Valencia.**

POR:

ANALI MARTINEZ MIGUEL

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de:

INGENIERA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México. Junio 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“Evaluación Antibacteriana y Antioxidante de Extractos de la Cascara de naranja (*Citrus sinensis*) variedad Valencia”

TESIS

Que se somete a consideración del H. jurado examinador como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Presentada por:

ANALI MARTINEZ MIGUEL

El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el consiguiente comité:

Dr. Mario A. Cruz Hernández
Presidente del jurado

M.C Armando Robledo Olivo

Sinodal

Dra. Ruth Belmares Cerda

Sinodal

Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Sinodal

Dr. Ramiro López Trujillo
Coordinador de la División de Ciencia Animal



Buenavista, Saltillo Coahuila, México. Junio 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“Evaluación Antibacteriana y Antioxidante de Extractos de la Cascara de naranja (*Citrus sinensis*) variedad Valencia”

TESIS

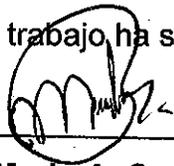
Que se somete a consideración del H. jurado examinador como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Presentada por:

ANALI MARTINEZ MIGUEL

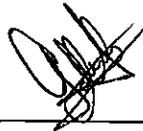
El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el consiguiente comité:



Dr. Mario A. Cruz Hernández
Director

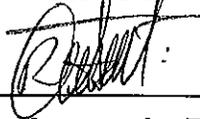


Dra. Ruth Belmares Cerda
Director Externo



Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Asesor



M.C. Armando Robledo Olivo

Asesor

Buenavista, Saltillo Coahuila, México. Junio 2014

AGRADECIMIENTOS

A Dios: por ayudarme a terminar este proyecto, gracias por darme la fuerza y el coraje para hacer este sueño realidad, por estar conmigo en cada momento de mi vida. Por cada regalo de gracia que me has dado, un aprueba más de tu fidelidad, prometiste y diste mucho más allá que fue mis expectativas, por lo que me doy cuenta que no te vale mi desarrollo, pero antes de ser un profesionista quiero siempre ser tu hija, ya que es el mayor privilegio que podamos tener, más valioso que todos los títulos de la tierra.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro mi Alma Terra Mater: por abrirme las puertas, cobijarme en su seno y por permitir prepararme como ser humano y profesionista, brindándome las bases para salir y enfrentarme al mundo, resolviendo los problemas que se me presenten en mi vida cotidiana y laboral por todo esto mi más sincero agradecimiento. Al departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Profesores y personas que laboran en el mismo, del cual me siento muy orgullosa de ser egresada.

A mis queridos padres: por estar conmigo en cada etapa de mi vida, por el apoyo moral, espiritual y económico que me brindaron, sobre todo cuando me ausente de casa, además por todos los esfuerzos que hacen para el bienestar de mis hermanos y el mío, por eso y mucho más gracias.

A mis hermanos: gracias por su cariño y apoyo incondicional que siempre me han brindado, agradezco a Dios por dármelos.

A mis asesores de tesis: Principalmente al Dr. Mario A. Cruz Hernández, a la Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda, Dra. Gabriela Hernández Vázquez y al M.C. Armando Robledo Olivo, gracias por impartirme sus valiosos conocimientos, ayuda, su esfuerzo, atención y orientación a lo largo del proyecto.

Maximino Sánchez Rivera: Tu apoyo me impulso a seguir y no flaquear, ser mi compañía en momentos alegres y tristes, brindarme paciencia, ayuda en todo momento, dándome ánimos de fuerza y amor para seguir adelante.

A mis abuelos: Antonia, Bonifacio, Carmen y Nicolás, a pesar de que sus palabras hayan sido pocas, significan más que eso, siempre han estado presente en mi vida, y los llevare como el más noble recuerdo.

A mis amigos: Sandra, Rosa, Lulú, Juan, Lorena, Irene que conocí en mi Universidad y fueron mis compañeros de carrera, les agradezco su apoyo, paciencia y sobre todo su amistad brindada. Lucero, Ethel, Claudia, Angélica, muchas gracias por formar parte de esto.

Familia Pineda Gaytán: De una manera muy especial por la amistad brindada, y ser un ejemplo en mi vida, siempre serán un bonito recuerdo.



DEDICATORIAS

A mis padres

Mateo Martínez Lucas y Minerva Miguel Segura, quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, dedicación, palabras de aliento, su tenacidad y lucha interminable nunca bajaron los brazos para que yo tampoco lo haga, aun cuando todo se complicaba han hecho de ellos un gran ejemplo a seguir por mí y por mis hermanos y sin ellos jamás hubiera podido conseguir lo que hasta ahora, gracias por todo su amor.

A mis hermanos

Liliana, Lizbeth, Saúl, Nicolás, Marco Ulises, que de una u otra manera son la razón por la cual me vi en este punto de mi vida, a puertas del título profesional tan anhelado. Son el mejor regalo en mi vida.

A mis sobrinos

Amisadai y Gael, que han sido un motivo más de mi alegría y amor.

“Con todo mi amor y mi más sincero agradecimiento a ustedes, LOS AMO”

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	10
CAPÍTULO I.....	12
1.1 INTRODUCCION	12
1.2 OBJETIVO GENERAL	14
1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
1.3 HIPÓTESIS	14
1.4 JUSTIFICACIÓN	15
CAPITULO II.....	16
2.1 REVISIÓN DE LITERATURA.....	16
2.1.1 Naranja valencia (<i>C. sinensis</i>).....	16
2.1.2 Aprovechamiento de la cáscara de naranja valencia, (<i>c. sinensis</i>)....	17
2.1.3 Aceite esencial de la cáscara de naranja.	19
2.1.3.1 Composición físico- químico de los aceites esenciales.	19
2.1.3.2 Clasificación de los aceites esenciales.....	22
2.1.3.3 Propiedades de los aceites.	22
2.1.3.4 Actividad biológica de los aceites.....	23
2.1.3.5 Características de los cítricos.....	24
2.1.3.6 Flavonoides.....	25
2.1.3.7 Extracción y aislamiento de aceites esenciales.....	25
2.1.3.8 Métodos de obtención de aceites esenciales	26
2.1.3.9 Extractos etanólicos.	27
2.1.3.10 Consistencia de los extractos.....	28
2.1.3.11 Características de los extractos.	29
2.1.3.12 Conservación de los extractos	29

2.1.4	Actividad antimicrobiana de aceites esenciales.....	30
2.1.4.1	Bacterias patógenas.....	31
2.1.4.1.1	Escherichia coli	31
2.1.4.1.2	Salmonella typhi.	32
2.1.4.1.3	Staphylococcus aureus.	32
2.1.4.2	Mecanismos de resistencia de las bacterias	32
2.1.5	Antibiogramas.....	33
2.1.6	Antioxidantes	34
2.1.6.1	Capacidad Antioxidante (Captación de radicales libres).	34
2.1.6.2	Radicales libres y compuestos antioxidantes.	35
2.1.6.3	Extracción de compuestos antioxidantes de los alimentos.....	36
2.1.6.4	Pruebas utilizadas para detectar y cuantificar antioxidantes en extractos vegetales.....	36
2.1.6.5	Métodos para determinar actividad antioxidante (ABTS Y DPPH). 37	
2.1.6.6	Atribución de los compuestos fenólicos en la actividad antioxidante. 37	
2.1.6.7	Beneficios que se obtienen de una dieta rica en polifenoles.....	38
CAPITULO III.....		40
3.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1.1	Etapa 1: Tratamiento térmico de la cascara de naranja y extracción de las fitomoléculas de interés por hidrodestilación.....	40
3.1.1.1	Preparación de la materia prima.	40
3.1.1.2	Obtención de extractos de la cascara de naranja mediante tratamiento térmico (hidrodestilación).....	42

3.1.2	Etapa 2: Identificación, Conservación y Evaluación de la Actividad Antibacteriana de los extractos, etanólico, etanol 50% y acuoso contra bacterias patógenas.....	43
3.1.2.1	Identificación macroscópicamente y microscópicamente de <i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	43
3.1.2.2	Evaluación de la Actividad Antibacteriana de <i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	44
3.1.3	Etapa 3. Determinar la Actividad Antioxidante Mediante el Método ABTS y DPPH.....	45
3.1.3.1	Evaluación de la Actividad Antioxidante mediante reducción DPPH en microplaca.	45
3.1.4	Evaluación de la Actividad Antioxidante mediante reducción ABTS..	46
	CAPITULO IV	48
4.1	RESULTADOS Y DISCUSION.....	48
4.1.1	Etapa 1: Tratamiento térmico de la cáscara de naranja y extracción de las fitomoléculas de interés por hidrodestilación.....	48
4.1.1.1	Rendimiento de la materia prima.....	48
4.1.1.2	Extracción de fitomoléculas de la cáscara de naranja mediante tratamiento térmico (hidrodestilación).....	49
4.1.2	Etapa 2: Identificación, conservación y evaluación antibacteriana de los extractos etanólicos, etanol 50% y acuosos contra <i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	55
4.1.2.1	Identificación macroscópicamente y microscópicamente.	55
4.1.3	Cultivo de bacterias patógenas.....	56
4.1.4	Etapa 3: Determinar la actividad antioxidante mediante 2 métodos (ABTS Y DPPH), de los extractos; etanol 50%, etanol y acuoso.....	60
	CAPITULO V	62

5.1	CONCLUSIONES.....	62
	CAPITULO VI	63
6.1	RECOMENDACIONES	63
	CAPITULO VII	64
7.1	BIBLIOGRAFIA	64
	CAPITULO VIII	68
8.1	ANEXO.....	68
8.1.1	Tinción de Gram.	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Partes de la naranja.....	16
Figura 2.	Vista microscópica de la cáscara de naranja.....	19
Figura 3.	Mecanismo de resistencia antimicrobiana (Moreno C, 2004).	33
Figura 4.	Preparación de la cascara de naranja para el tratamiento térmico. 40	
Figura 5.	Estufa con aire forzado (Yamato).....	41
Figura 6.	Molino de pulverización (GE Commercial Motors).	41
Figura 7.	Equipo de hidroddestilación (González A, 2004).	42
Figura 8.	Rotavapor (Yamato, Water Bath BM 400).	42
Figura 9.	Microscopio (Labomed, Sumilab).	43
Figura 10.	Cultivo de bacterias patógenas.	44
Figura 11.	Antibiogramas contra <i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	45
Figura 12.	Halos de inhibición de bacterias patógenas por el método de difusión en disco	45
Figura 13.	Lector de Microplaca (Bio- Tek Instruments).....	46
Figura 14.	Espectrofotómetro.	47
Figura 15.	Temperatura a la cual empieza la extracción de cada muestra. 49	
Figura 16.	Tiempo de extracción a la cual los extractos inician su proceso de recuperación con los diferentes solventes y temperaturas..	50
Figura 17.	Cantidad recuperada de extracto con fitomoléculas de interés, en los diferentes agentes extractantes y sus temperaturas.	51
Figura 18.	Cantidad total de extracto recuperado en la hidroddestilación con los diferentes solventes y temperaturas después del rotavapor.	51
Figura 19.	Cantidad de etanol recuperado.....	53
Figura 20.	Extractos obtenidos del experimento.....	55
Figura 21.	Bacterias patógenas observadas mediante el microscopio.....	56
Figura 22.	Actividad antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i>	57
Figura 23.	Actividad antibacteriana contra <i>Escherichia coli</i>	58

Figura 24.	Actividad antibacteriana contra <i>Salmonella typhi</i>.....	59
Figura 25.	Actividad antioxidante (DPPH).....	60
Figura 26.	Actividad antioxidante (ABTS).....	61
Figura 27.	Tinción de Gram.	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición físico-química de la cáscara de naranja.....	17
Tabla 2. Concentración relativa de los principales componentes en el aceite esencial de naranja (Yañez R. y col., 2007).	21
Tabla 3. Relación de variables durante la extracción.	42
Tabla 4. Composición de Agar Nutritivo	44
Tabla 5. Diferentes solventes etanólicos más usados en procesos de hidrodestilación.....	54
Tabla 6. Identificación microscópica.....	55

RESUMEN

La proliferación de enfermedades causada por microorganismos patógenos es una preocupación generalizada, que constituye un factor de riesgo para la salud pública, es por esto que se buscan fuentes naturales que inhiban el crecimiento bacteriano; descubriendo en las plantas compuestos bioactivos para tal fin. Los investigadores proponen el uso de fitomoléculas obtenidas en combinación con tratamientos suaves podría permitirnos obtener productos más seguros con mejores propiedades sensoriales, sin cambios en su composición o naturaleza.

Por ese motivo el presente trabajo busca obtener, y evaluar la capacidad de la naranja valencia como antibacteriano y antioxidante y darle un valor agregado al subproducto. Fueron empleados 6 extractos para realizar la cuantificación del halo de inhibición que presentan con respecto a las tres bacterias patógenas que son *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*, de nuestro interés en este trabajo. Las bacterias Gram negativas presentaron una mayor sensibilidad a los compuestos antimicrobianos de la cascara de naranja, a diferencia de la Gram positivas. Los extractos etanólicos presentan mayor actividad antibacteriana (M1:17.6mm, M2: 18.9mm, M4 17.7 mm.), esto porque el solvente al estar en contacto con las partículas de la muestra favorece la interacción y el arrastre de los compuestos potenciando su actividad.

En la actividad antioxidante los datos obtenidos son bajos (de 2-16 %), en comparación con estudios realizados en otros cítricos con valores de 46.36 en naranja, 66.88 en mandarina y 38.88 en toronja, (Rincón a. y col., 2005). esto puede deberse a que el tratamiento térmico de la cascara de naranja y los tiempos dados no favoreció la extracción de fitomoléculas de interés y a las cuales se les atribuye las propiedades antibacteriana y antioxidante. Esto quiere decir que es efectivo dependiendo de la aplicación y método de obtención de estos compuestos.

Palabras clave: Actividad antibacteriana, antioxidante, subproducto de naranja, Inhibición.

1.1 INTRODUCCION

El interés mundial en bio-conservación de los sistemas alimentarios tiene incremento debido a grandes pérdidas económicas y contaminación de productos alimenticios por patógenos y es a menudo responsable de la pérdida de calidad y la seguridad de estos. La preocupación por el patógeno y el deterioro del microorganismo en los alimentos es cada vez mayor debido al aumento de brotes de enfermedades causadas por los alimentos. Actualmente existe un interés mayor usar antibacteriano natural, como extractos de hierbas, y especias para la conservación de alimentos. Aceites esenciales derivados de plantas y extractos de diversas especies, han sido utilizados como agentes naturales para la conservación de alimentos y bebidas debido a los compuestos antimicrobianos (Nychas y col., 2003).

Los subproductos agroindustriales presentan, sin embargo, un amplio potencial de aprovechamiento que debe ser rentabilizado de manera eficiente (Arvanitoyannis y Varzakas, 2008). La posible integración de los subproductos de la industria agroalimentaria como ingredientes en nuevas formulaciones de alimentos supondría una solución a la actual problemática medioambiental, y la posibilidad de obtener nuevos productos alimenticios que logren satisfacer las necesidades de los consumidores (Aruoma y col., 2012).

Tradicionalmente, para asegurar la inocuidad de los alimentos y prolongar su vida útil, la aplicación de tratamientos térmicos prolongados y el uso de conservantes químicos han sido las metodologías más empleadas (Raso y Barbosa., 2003). Sin embargo, los consumidores actuales son cada vez más conscientes de la relación existente entre una alimentación saludable y una mejora de la calidad de vida (Hamm y Bellows, 2003), por ello buscan alimentos frescos o mínimamente procesados sin adicción de aditivos químicos.

Los estudios han demostrado una significativa reducción del riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas, por ejemplo el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y Alzheimer asociada al consumo de frutas y vegetales (Ladaniya M.S, 2008).

Los antimicrobianos de alimentos son compuestos o sustancias químicas que pueden retardar el crecimiento o causar la muerte microbiana cuando estos son incorporados en una matriz de alimentos (Davidson y Zivanovic, 2003). Los principales blancos de acción de los antimicrobianos son los microorganismos patógenos productores de toxinas o causantes de infecciones y microorganismos deteriorantes, cuyos productos finales metabólicos causan olores y sabores desagradables, problemas de textura y decoloración del producto (Davidson y Taylor, 2007).

La contaminación de microorganismos en los alimentos va en aumento, es por eso que se están buscando nuevas alternativas de compuestos de origen natural que potencien mayor la inhibición en este caso de las bacterias patógenas *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*. Además los aceites esenciales están compuestos de fitomoléculas que ayudan a contrarrestar enfermedades en los seres humanos.

Este subproducto de cítricos en la agroindustria genera un valor agregado del aprovechamiento de la cascara.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Obtener y evaluar la capacidad de los extractos de cascara de naranja valencia (*Citrus sinensis*), como agentes antibacterianos sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, y *Salmonella typhi*, así como su la actividad antioxidante.

1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener extractos etanólicos, etanólicos 50% y acuosos de la cascara de naranja mediante tratamiento térmico (hidrodestilación), para su evaluación antibacteriana y antioxidante.
2. Identificar de manera macroscópica y microscópica las bacterias patógenas.
3. Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos, etanólicos 50% y acuosos sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, y *Salmonella typhi*.
4. Determinar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos, mediante los métodos (ABTS y DPPH).

1.3 HIPÓTESIS

Los extractos de la cascara de naranja tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas; *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* y presentan actividad antioxidante debido a la naturaleza de sus compuestos bioactivas.

1.4 JUSTIFICACIÓN

La importancia de este subproducto de la agroindustria de naranja en México, particularmente en Álamo Temapache Veracruz, siendo el principal productor de la naranja valencia. Engloba varios sectores ya que se trata de un residuo que tiene mal uso por parte de las jugueras, siendo su destino a campo abierto o a otros lugares, generando contaminación al medio ambiente.

En este trabajo, se da un enfoque especial a las agroindustrias para la recuperación de los recursos como es la cascara de naranja, que estas jugueras conozcan la importancia de aprovechar los residuos para disminuir la contaminación que estos generan. Por otro lado implementar tecnologías emergentes para el conocimiento y las ventajas que conlleva al dar un buen tratamiento a estos subproductos.

Sin embargo, la mayoría de este tipo de industrias no tiene algún plan para estos residuos, debido al alto costo de su reutilización y por el contrario, los mezclan junto con la basura en los vertederos o rellenos sanitarios.

Una opción que tenemos en la industria de los alimentos es que produce grandes cantidades de residuos que pueden ser aprovechados de diversas formas. Entre estos residuos se encuentran los provenientes de las frutas, los cuales pueden ser utilizados en alimentación animal y humana, abonos, pectinas y los aceites esenciales siendo el tema de interés.

Además, las propiedades antimicrobianas y actividad antioxidante es una opción aceptada por varios autores, que buscan la incorporación de nuevos conservadores y aditivos que provengan de fuentes naturales, para disminuir la contaminación de bacterias patógenas en los alimentos, así también para disminuir riesgos de enfermedades al ser humano que son provocados por las bacterias patógenas que son; *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*.

2.1 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.1 Naranja valencia (*C. sinensis*)

La naranja, es considerada como una de las frutas de mayor importancia en el país, por la superficie destinada para su cultivo, como la producción y el consumo per cápita. Sus características nutricionales ayudan al fortalecimiento de las defensas del organismo, debido a su contenido de vitaminas "C", sales, minerales, ácidos orgánicos, pectina, entre otros. (Infoagro).

Pertenece a la familia; Rutacea

Género; citrus

Especie; *citrus sinensis* (L) Osb

El fruto: Hesperidio. Consta de: exocarpo (flavedo; presenta vesículas que contienen aceites esenciales), mesocarpo (albedo; pomposo y color blanco) y endocarpo (pulpa; presenta tricomas con jugo). (Infoagro).

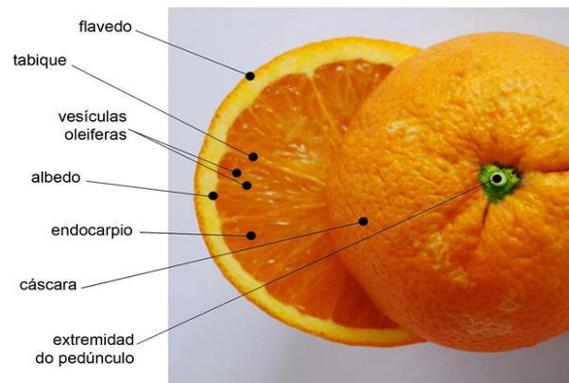


Figura 1. Partes de la naranja.

Se consume en forma fresca y en jugo, principalmente. Lo primero es característico de los países productores en vías de desarrollo y el segundo, de los países industrializados. Existiendo tres grupos de naranja que son Navel, Sangre y

valencia del grupo Blancas. Este último tiene una doble aptitud para el consumo en fresco y más aún, para jugo. (Gómez M y col., 1997).

Tabla 1. Composición físico-química de la cáscara de naranja.

Componente principales	Cantidad (%)
Materia seca	90
Proteína	6
Carbohidratos	62.7
Grasas	3.4
Fibra	13
Cenizas	6.9

(Martínez A, 2003)

Además, la cáscara de naranja posee enzimas como acetil esterasa, peroxidasa y pectinesterasa. Los pigmentos mayoritarios son los carotenoides, el 60% del total de carotenoides de color naranja están en la cáscara. Los carotenoides son producidos en los cromoplastos en los flavedos de las células. La cáscara también posee ácidos, siendo el principal de ellos el ácido cítrico, además de pequeñas cantidades de ácido tartárico, málico y oxálico. La presencia de estos ácidos en la cáscara es la razón por la cual el pH de la cáscara es de 5.

2.1.2 Aprovechamiento de la cáscara de naranja valencia, (c. *sinensis*)

Los subproductos agroindustriales presentan, sin embargo, un amplio potencial de aprovechamiento que debe ser rentabilizado de manera eficiente (Arvanitoyannis y Varzakas ,2008).

Hasta la fecha, entre las principales vías de aprovechamiento de dichos subproductos vegetales destacan: (i) su uso como bioadsorbentes durante la etapa de pre-tratamiento de aguas residuales; (ii) agentes fotoquímicos en agricultura; (iii) alimentación directa del ganado o para la fabricación de piensos;

(iv) utilización en la industria del papel por su alto contenido en celulosa; (v) fabricación de biocombustibles; y recientemente, (vi) aislamiento de ingredientes funcionales y, (vii) obtención de alimentos con un valor nutricional añadido (Gracia R., 2004).

Con el fin de prevenir los problemas relacionados con la eliminación de este producto y las preocupaciones ambientales vigentes, todos los residuos se debe considerar la materia prima si un procedimiento de valoración se va a desarrollar (Moller, 2001). Aunque los residuos de cascara de naranja puede ser utilizado para una amplia variedad de propósitos, hasta hace relativamente poco no había medio satisfactorio de disposición distintos del vertido de los residuos en la fabricación de alimentos para el ganado o la quema (La puerta y col., 2008). Entre otros, estos incluyen el uso de los residuos para producir fertilizantes, aceites esenciales, pectina, etanol, enzimas industriales, proteína de las células individuales, absorbentes de contaminantes y suplementos de pasta de papel. (Martin y col., 2010).

Los desechos de naranja pueden ser un importante subproducto en las plantas procesadoras para obtener el jugo y los aceites esenciales. Un alto porcentaje de esta producción (70%) se utiliza para la fabricación de productos tales como jugo o mermelada. Por otra parte, aproximadamente el 50-60% de la fruta procesada se transforma en residuos de cascara de cítricos, que se compone de la cascara, las semillas y los residuos de membrana (Wilkins y col., 2007).

La agroindustrialización de la naranja se concentra principalmente en la producción de jugos. Durante este proceso, entre el 23 y 40 % en peso de la fruta se obtiene como desecho principal, generando un problema ambiental en la disposición de los mismos. Una parte de estos desechos de cascara son utilizados como alimento animal, sin embargo las cascara de naranja tiene compuestos como los aceites esenciales y las pectinas que pueden ser aprovechados para generar un mayor valor agregado al proceso. (Marina M, 2001).

2.1.3 Aceite esencial de la cáscara de naranja.

Son líquidos volátiles, en su mayoría insolubles en agua, pero fácilmente solubles en alcohol, éter y aceites vegetales y minerales. Por lo general, no son oleosos al tacto. En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados, por ejemplo, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes derivan biológicamente del ácido mevalónico y se les cataloga como terpenos, siendo los más abundantes los monoterpenos (C10) y los sesquiterpenos (C15). Son ingredientes básicos en la industria de los perfumes y se utilizan en jabones, desinfectantes y productos similares (Cabra R., 1988).

2.1.3.1 Composición físico- químico de los aceites esenciales.

Están contenidos en sacos o glándulas de aceite que varían en diámetro desde 0,4 hasta 0,6 mm o en la porción anaranjada de la cascara y actúa como una barrera toxica natural para muchos microorganismos e insectos. Los sacos o glándulas están situados a profundidades irregulares en el flavedo, que se encuentra en la corteza exterior de la fruta. Cáscara de naranja contiene típicamente 5.436 kg de aceite por 1.000 kg de naranjas, de los cuales aproximadamente el 90% es el d-limoneno (Braddock y col., 1986).



Figura 2. Vista microscópica de la cáscara de naranja.

Los aceites esenciales se forman en las partes verdes (con clorofila) del vegetal y al crecer la planta son transportadas a otros tejidos, en concreto a los brotes en flor. Se desconoce la función exacta de un aceite esencial en un vegetal; puede ser para atraer los insectos para la polinización o para repeler a los insectos nocivos, o puede ser simplemente un producto metabólico intermedio (López, 2005).

El aceite esencial de limón y naranja contiene más del 90 % de d-limoneno, componente mayoritario en su composición normal y además, en menor proporción poseen una gran cantidad de terpenos (Weiss, 1997).

Los aceites esenciales de cítricos son insolubles en agua, pero se hacen más solubles cuando se emplean en bajas concentraciones usando alcohol como disolvente. En ocasiones, forman soluciones oscuras que se aclaran con dificultad. De aquí que sea deseable eliminar los terpenos y sesquiterpenos. Para ello se pueden aplicar dos métodos, por destilación fraccionada a presión reducida, o la extracción de los compuestos oxigenados más solubles (principales portadores del olor), con alcohol diluido y otros disolventes (Sánchez y col., 1994).

La calidad del aceite depende de factores que influyen sobre la composición como las condiciones geobotánicas del medio (clima, altitud, tipo de suelo, cantidad de lluvias, etcétera.), edad de la planta y estado fenológico, método de cultivo (uso de fertilizantes, abono, pesticidas, otros químicos, etcétera.), época de recolección, modo de manejo y almacenamiento del material vegetal (fresco, seco, fermentado, etcétera.) y método de obtención del aceite (destilación, maceración, prensado, extracción con solventes, extracción con fluidos supercríticos, etcétera. (Díaz J., 2002).

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden tener la siguiente naturaleza química:

- ❖ Compuestos alifáticos de bajo peso molecular(alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, esteres y ácidos)
- ❖ Monoterpenos
- ❖ Sesquiterpenos
- ❖ Fenilpropanos

En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados.

El aceite esencial es extraído principalmente por presión o destilación de la corteza de la fruta. Poseen un color característico que se debe a los colorantes disueltos del tipo carotenoide. Su aroma es a naranja y está compuesto principalmente por hidrocarburos terpénicos lo que lo hace propenso a la oxidación a condiciones ambientales pues la fracción terpénica se oxida rápido y genera un aroma rancio A continuación se muestra una tabla con los principales componentes del aceite esencial de naranja obtenido a partir de la cáscara hecho en un estudio realizado por Mancilla Lugo en la Universidad de Pamplona, Colombia. (Rueda, Yáñez y col., 2007).

Tabla 2. Concentración relativa de los principales componentes en el aceite esencial de naranja (Yáñez R. y col., 2007).

Componente	Concentración relativa (%)
Isocitroneleno	0.43
Canfeno	1.62
Transp-Mentano	1.66
p-Menta-1 (7),8-dieno	0.69
limoneno	90.93
Dihidromircenol	0.45
Trans-Dihidrocarvona	1.78

2.1.3.2 Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluídas, bálsamos y oleorresinas. Las Esencias fluídas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los Bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, entre otros. Las Oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas.

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecida con linalool, por mencionar algunos.

Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.). (Carla P. y col., 2012)

2.1.3.3 Propiedades de los aceites.

Las propiedades que presentan los aceites esenciales son beneficiosas para el ser humano y por lo tanto son cotizados en el mundo cuando son de origen natural.

Dependiendo de la procedencia del aceite, de la forma de extracción y de sus componentes serán las propiedades del mismo, sin embargo todos los aceites 10

esenciales presentan ciertas propiedades a diferentes niveles, los cuales darán el uso que tendrá el mismo. A continuación se hablará de las diferentes propiedades que tienen los aceites esenciales. (Carla P. y col., et al 2012).

2.1.3.4 Actividad biológica de los aceites.

Gracias a las propiedades de los polifenoles, y a su fuerte actividad biológica como agentes antimicrobianos, superior a la de los antioxidantes obtenidos por síntesis química, pueden llegar a promover la carcinogénesis, (Tripoli E. 2007). Varios autores han estudiado la relación entre el contenido de polifenoles y la actividad antimicrobiana, encontrando asociación entre ellos en diferentes extractos de plantas y frutas. (Alberto M. y col., 2010).

Los extractos que presentan mayores halos de inhibición pueden tener un mayor contenido de compuestos fenólicos, lo que indicaría una relación directa entre el contenido de polifenoles y el efecto antimicrobiano de los extractos.

La proliferación de enfermedades causada por microorganismos patógenos es una preocupación generalizada, que constituyen un factor de riesgo para la salud pública, es por esto que se buscan fuentes naturales que inhiban el crecimiento bacteriano, descubriendo en plantas en este caso la cascara de naranja valencia para tal fin.

Los productos naturales han desempeñado un papel importante en el desarrollo de fármacos, los cuales han sido la base de las primeras medicinas permitiendo el descubrimiento de diferentes productos, entre ellos los antibacterianos, en los últimos años más de la mitad de los productos farmacéuticos usados son de origen natural. (Corzo B., 2012).

Este es el caso de las frutas cítricas, ricas en fibra, vitaminas y minerales, carotenoides y los flavonoides. (Iguar et al, 2013; Trípoli et al, 2007). Los estudios han demostrado una significativa reducción del riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas, por ejemplo el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y Alzheimer asociada al consumo de frutas y vegetales (Ladaniya M.,

2008). Además, diversos estudios atribuyen propiedades antimicrobianas, bacteriostáticas y/o bactericidas a los aceites esenciales presentes en las frutas (Dembitsky y col., 2012).

2.1.3.5 Características de los cítricos

Los cítricos se caracterizan fundamentalmente por sus frutos grandes que contienen cantidades abundantes de ácido cítrico, componente con fórmula $C_3H_4OH(COOH)_3$ cual les proporciona el característico sabor ácido. Además todos los miembros del género *Citrus* contienen otros componentes que les otorgan aromas muy profundos. (Gergensen y León, 1999).

De la naranja, no solamente se aprovechan los jugos alimenticios, sino que de la cáscara de la naranja se pueden obtener aceites que se utilizan como aromatizantes en diferentes industrias. Su aceite esencial es uno de los ingredientes básicos en las industrias de perfumería, alimentos, agronómica y farmacéutica (Díaz, 2002).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende de su composición química. EOs cítricos son mezclas complejas de aproximadamente 400 compuestos cuyo contenido depende de los métodos de cultivo del cítrico, extracción y separación específicos. Cítricos Eos contienen 85-99% volátil y 1 15% de compuestos no volátiles. Los componentes volátiles son una mezcla de monoterpenos (tales como limonenos) y los hidrocarburos de sesquiterpenos y sus derivados oxigenados, incluyendo aldehídos (tales como citral), cetonas, ácidos, alcoholes (tales como linalol) y esterés.

Los aceites esenciales de cítricos son insolubles en agua, pero se hacen más solubles cuando se emplean en bajas concentraciones usando alcohol como disolvente. En ocasiones, forman soluciones oscuras que se aclaran con dificultad. De aquí que sea deseable eliminar los terpenos y sesquiterpenos. Para ello se pueden aplicar dos métodos, por destilación fraccionada a presión reducida, o la extracción de los compuestos oxigenados más solubles ISSN 0120-4211 BISTUA Vol. 5 No.1 (principales portadores del olor), con alcohol diluido y otros disolventes (Sánchez y col., 1994).

2.1.3.6 Flavonoides

Entre los metabolitos secundarios presentes en la cáscara de los cítricos se encuentran los flavonoides, los cuales constituyen el grupo más importante dentro de los compuestos fenólicos porque son considerados micronutrientes en la dieta animal. Estos compuestos abundan en la naturaleza, son de bajo peso molecular y comparten el esqueleto común de difenilpiranos, dos anillos bencénicos unidos a través de un anillo pirona.

La estructura molecular de los flavonoides consiste en un esqueleto de 15 átomos de carbono (C₁₅). La biosíntesis de esta unidad C₆C₃C₆, deriva de dos rutas separadas. Los anillos A provienen de la condensación de dos unidades malonil coenzima A y acetil coenzima A. La otra ruta forma el anillo B y los átomos de carbono 2, 3 y 4, y deriva del ácido cinámico. El primer intermediario estable es la chalcona. Los pasos subsecuentes conducen a la formación de varios flavonoides, los cuales controlan los patrones de hidroxilación, los niveles de oxidación, las posiciones de Ometilación y la glicosilación (Mabry y Albornoz, 1980).

La estabilidad durante los procesos de extracción y purificación es debida a la alta resonancia que le confieren los anillos bencénicos; los flavonoides presentan una alta estabilidad molecular, soportando bajas y altas temperaturas, hasta de 300°C. Pueden ser extraídos inicialmente con solventes orgánicos sin perder sus propiedades estructurales, y son muy estables al calor y a las reacciones de oxidación, resistiendo la mayoría de los tratamientos térmicos que se emplean en la manufactura de los alimentos enlatados (Badúí, 1996).

2.1.3.7 Extracción y aislamiento de aceites esenciales.

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: destilación con vapor de agua, destilación con agua, extracción con solventes volátiles, prensado en frío, hidrofución, enfleurage y con fluidos supercríticos. (Cerutti M y Neumayer F., 2004).

2.1.3.8 Métodos de obtención de aceites esenciales

a) Destilación por arrastre de vapor

Es el método más utilizado. Se genera vapor normalmente en un hervidor y luego se inyecta al destilador por donde pasa a través del material botánico. El principio básico de la destilación de dos líquidos heterogéneos, como el agua y un aceite esencial, es que cada uno ejerce su propia presión de vapor como si el otro componente estuviera ausente. Cuando las presiones de vapor combinadas alcanzan la presión del recinto, la mezcla hierve.

Aceites esenciales con puntos de ebullición de hasta 300 °C, evaporaran a temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua. El vapor arrastra D-Limoneno, a pesar de que este tenga un punto de ebullición más alto que el agua (352°F). El vapor y el aceite esencial son condensados y separados.

Algunos químicos, no volátiles en el vapor, quedan en el destilador; estos compuestos no volátiles son responsables del sabor más que del olor. Algunas sustancias muy volátiles se pierden en la destilación. Además el proceso en sí puede inducir cambios químicos, como la oxidación o hidrólisis. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada. (Chem J,1980).

b) Destilación con agua

Una de las diferencias más marcadas con la destilación por arrastre de vapor, es que en ésta el material botánico está en contacto con agua hirviendo. Un problema frecuente de este tipo de destilación, es el “olor a alambique o destilador”, que se da normalmente si el destilador se calienta a fuego directo; este olor no deseado desaparece en el almacenamiento de los aceites esenciales.

Existe otro método llamado destilación con agua y arrastre de vapor, que combina ventajas de los dos anteriores. El material botánico se encuentra separado del agua hirviendo la cual se encuentra en la parte inferior del destilador y el material

botánico es sostenido por una rejilla. Si el destilador se calienta lentamente este método reduce el fenómeno de “olor a alambique o a destilador”. (Cerutti M y Neumayer F, 2004).

c) Extracción con solventes volátiles

En el método de extracción con solventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles. (Chem J, 1991).

Realizaron un estudio comparativo de los aceites esenciales extraídos por destilación con vapor y presión en frío de las cáscaras y hojas de los cítricos colombianos, mediante análisis de cromatografía de gases de alta resolución usando un detector selectivo de masas, concluyendo en que no existe una diferencia cuantitativa ni cualitativa en la composición entre los aceites esenciales de las cáscaras de los cítricos obtenidos por los dos métodos, (Stashonko, 1995).

2.1.3.9 Extractos etanólicos.

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamientos de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad de partes de una planta fresca o seca. (Ruiz Susunaga, 2000).

Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un proceso físico. Estos procesos pueden ser

sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado. (González A., 2004).

El proceso de extracción de compuestos fenólicos en diferentes plantas y frutas está influenciado por su naturaleza química, por el método empleado y la presencia de sustancias interferentes.

Los solventes más empleados están constituidos por mezclas acuosas de etanol, metanol y acetona; asimismo indican que la selección óptima del solvente para la extracción de los compuestos fenólicos depende del tipo de matriz, (Moure y col., 2001).

2.1.3.10 Consistencia de los extractos.

Álzate en 1990 descubrió la consistencia ideal que debían tener los extractos. De acuerdo con este aspecto comúnmente los extractos se clasifican en cuatro grupos: blandos, firmes, secos y fluidos (Barreto J, 1997)

a) Extractos blandos

Tienen la consistencia de la miel espesa; algunas veces, debido a la absorción de la humedad atmosférica, presentan una consistencia menos densa (Barreto J, 1997).

b) Extractos firmes o de consistencia pilular

Como su nombre lo indica deben tener una estrecha semejanza con la masa con la cual se fabrican o manufacturan las píldoras; deben tener la característica especial de no adherirse a los dedos (Barreto J, 1997).

c) Extractos secos:

Se les conocía con la denominación de sales esenciales. Son los extractos en los cuales el disolvente ha sido casi completamente eliminado. Contiene tan solo del 5% al 8% de agua. Se reducen fácilmente a polvo y facilitan su manipulación y dosificación.

d) Extractos fluidos:

Son preparados en una forma tal que el peso del extracto corresponde exactamente al peso de la sustancia empleada como medicamento, desecada al aire y pulverizada (Barreto J, 1997).

2.1.3.11 Características de los extractos.

Investigaciones realizadas por Copas y Barreto entre 1988 y 1991, permitieron fundamentar las siguientes características específicas de los extractos.

- a) Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les ha dado su origen.
- b) La solubilidad de los extractos es variable y está en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometidos.
- c) Los extractos alcohólicos o parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles, especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte tienen índice de disolución, en el mismo título alcoholímetro del alcohol con el cual han sido preparados.

2.1.3.12 Conservación de los extractos

Un extracto seco o de tipo pilular se conserva mejor que un extracto acuoso. Esto no es totalmente exacto, pues la naturaleza del producto interviene igualmente. Algunos extractos se descomponen al aire, otros absorben humedad atmosférica. Según copas y barriga (1993), la conservación de los extractos deben cumplir las siguientes condiciones:

- a) Se deben conservar protegiéndolos de la luz
- b) Los envases deben estar bien tapados
- c) Deben estar en un medio seco

2.1.4 Actividad antimicrobiana de aceites esenciales

La cáscara de cítricos contiene aceites esenciales que son agentes antimicrobianos bien conocidos (Braddock y Plessas, 2007). La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende de su composición química.

❖ Actividad antimicrobiana

Una gran cantidad de aceites esenciales presentan actividad antimicrobiana la cual se debe a constituyentes activos atribuidos a isoprenos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, alcoholes y otros hidrocarburos. La acción antimicrobiana de estos componentes se debe a las características lipofílicas de los hidrocarburos y a las hidrofílicas de los grupos funcionales. El rango de actividad antimicrobiana ha sido definida de acuerdo a los componentes de la siguiente manera de mayor a menor: (Carla P y col., et al 2012).

- Fenoles
- Aldehídos
- Cetonas
- Alcoholes
- Esteres
- Hidrocarburos

Generalmente el mayor componente del aceite esencial es el responsable de la actividad antimicrobiana. Por otro lado se ha demostrado que la actividad de diferentes componentes combinados era menor que la actividad de uno solo de ellos. Debido a la larga lista de grupos que forman los aceites esenciales es muy común el no atribuir la actividad antimicrobiana del mismo a un solo compuesto. (Carla P y col., et al 2012).

Muchas investigaciones han demostrado el poder antimicrobiano de los aceites esenciales, especialmente los extraídos de frutas cítricas; en estos estudios se puede mencionar el de Dabbah et al, quienes encontraron que los aceites esenciales de mandarina, naranja y toronja mostraron tener actividad

antibacteriana contra cepas bacterianas de: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* entre otras. (Dabbah R y col., 1970).

En este sentido, son muchos los estudios que destacan la capacidad antimicrobiana de los compuestos terpénicos y flavonoides presentes en frutas cítricas (Viuda-Martos y col., 2008). Se trata de compuestos localizados mayoritariamente en la piel y semillas de las frutas y su composición es variable dependiendo de la variedad. Son compuestos lipídicos responsables de las propiedades aromáticas de los productos cítricos, además poseen propiedades antimicrobianas de interés para la industria alimentaria y farmacéutica (López y col, 2006).

Dichas propiedades antimicrobianas, han sido testadas tanto frente a bacterias Gram positivas como Gram negativas siendo especialmente eficaces frente a las Gram negativas, como en este caso *S. typhimurium* y *E. Coli O157:H7*. Sin embargo, hasta la fecha el mecanismo responsable de la actividad antimicrobiana de los terpenos y los flavonoides no está totalmente claro. (Raybaudi-Massilia y col, 2009).

2.1.4.1 Bacterias patógenas.

2.1.4.1.1 Escherichia coli .

Pertenece a las familias Enterobacteriaceae. De forma bacilar, casi siempre móvil, gramnegativo, no esporulado. Crece en un tiempo de 24 horas a 37 °C. Aerobio y anaerobio facultativo producen CO₂, y toxinas por lo tanto es enterotóxica. Por su especificidad está considerado como un buen índice de contaminación fecal, siendo huésped constante del intestino del hombre. Tiene el inconveniente de vivir poco tiempo en el ambiente extraentérico, por lo que su presencia en los alimentos indica contaminación reciente. No resiste a la pasteurización y es más resistente que la salmonella. (Pascual y Calderón V, 2000).

2.1.4.1.2 Salmonella typhi.

Son bacterias patógenas que crecen en un rango de temperatura de 25 °C a 40 °C, Bastones Gram negativos, anaerobios facultativos, temperatura optima de crecimiento es de 37 °, pH7, resistencia térmica de 60°C / 5 min, (UANL). Causante del padecimiento fiebre tifoidea que presenta fiebre alta, cefalea, anorexia, estreñimiento, diarrea. La transmisión de esta bacteria al organismo es a través de la ingesta de alimentos contaminados por contacto con heces fecales, aguas contaminadas. (Instituto salud pública, chile).

2.1.4.1.3 Staphylococcus aureus.

Es un microorganismos Gram positivo perteneciente a la familia micrococcaceae que se distingue de otras especies de estafilococos por la coloración dorada de sus colonias y el resultado positivo en las pruebas de coagulasa, fermentación del manitol y desoxirribonucleasa.

La causa es la enterotoxina producida por determinadas cepas toxigénicas de S. aureus. Se encuentra en piel, nariz, garganta, heridas, etc. También en alimentos muy manipulados, contaminados durante su producción, transporte o servicio (cremas, pastelería, carnes, natillas, salsas, patés). Son alimentos que se consumen sin calentar y mucho después de su preparación. (Carlos y col., 2005).

2.1.4.2 Mecanismos de resistencia de las bacterias

Las bacterias, por su tremenda capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de diana para un antibiótico (como la falta de pared en el Mycoplasma en relación con los betalactámicos). La resistencia adquirida es la realmente importante desde un punto de vista clínico: es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir

seguida de la selección de las mutantes resistentes (rifampicina, macrólidos), pero la resistencia transmisible es la más importante, estando mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra (Gomis y Gavilán M, 1995).

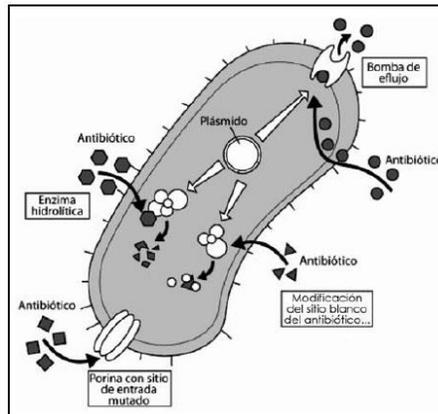


Figura 3. Mecanismo de resistencia antimicrobiana (Moreno C, 2004).

2.1.5 Antibiogramas

También conocidas como antibioticogramas o pruebas de susceptibilidad *in vitro* a los antibióticos. Son métodos de laboratorio que estudian la sensibilidad de un microorganismo a la acción de los antibióticos. El término sensible es muy usado como sinónimo de susceptible. Susceptible significa que un microorganismo es inhibido o muerto en las pruebas *in vitro* por una concentración del antibiótico accesible en la sangre, cuando ese mismo antibiótico se usa *in vivo*.

Estas pruebas pueden ser de tipo cualitativo si el resultado expresa la característica de susceptibilidad o resistencia de un microorganismo frente a un antibiótico; o de tipo cuantitativo si permite obtener información gradual de esa susceptibilidad. (Stephen y col., 2005).

2.1.6 Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos en donde se ha encontrado cierto grado de prevención y efectos terapéuticos en las especies reactivas de oxígeno que causan en la personas varias enfermedades. El peróxido de hidrógeno, una de las principales especies reactivas de oxígeno causa la per oxidación de los lípidos y un daño en el ADN. El estudio de la actividad antioxidante en los aceites esenciales se ha convertido muy atrayente en industrias con motivos de mejorar la salud y la preservación de alimentos. (Carla P y col., 2012).

2.1.6.1 Capacidad Antioxidante (Captación de radicales libres).

La capacidad antioxidante de los aceites esenciales se la debe a los fenoles presentes en su estructura. Casi todos los fenoles pueden funcionar como antioxidantes de la per oxidación de los lípidos porque pueden atrapar la cadena transportadora de los radicales de lípidos peróxilos. (Carla P y col., 2012).

Al igual que en los otros casos de propiedades, no hay un estudio que haya demostrado o dado la atribución de la actividad antioxidante a algunos de los componentes del aceite esencial pues hasta el compuesto minoritario puede jugar un papel importante en la propiedad antioxidante. (Carla P y col., 2012)

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre si pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios. Diversos compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los frutos para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (Arnous y Makris, 2002).

2.1.6.2 Radicales libres y compuestos antioxidantes.

Radical libre (RL) es cualquier especie química capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura. Como consecuencia, son altamente reactivos lo que hace que tengan una vida media del orden de milisegundos, aunque varía según el tipo de radical libre (Halliwell y col., 1992).

Los radicales libres también son conocidos como especies reactivas oxigénicas o del oxígeno, ROS, y especies reactivas del nitrógeno, RNS. A bajas concentraciones los radicales libres son necesarios para el buen funcionamiento celular pudiendo actuar como segundos mensajeros estimulando la proliferación celular y/o actuando como mediadores para la activación de las células. Sin embargo, un exceso de los mismos puede acumularse hasta niveles tóxicos dando como resultado que se produzcan diversas acciones sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden ser origen del daño celular (Davies, 1995).

La capacidad que tenga cada radical libre para actuar como agente oxidante está determinada por factores como su reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. Son responsables del daño oxidativo de macromoléculas biológicas como el DNA, lípidos, carbohidratos y proteínas.

Un antioxidante es “cualquier sustancia que en presencia de un sustrato oxidable retrasa o inhibe la oxidación del mismo”. Se caracterizan por ser muy heterogéneos, pueden ser hidrosolubles y liposolubles, localizarse intra y extracelularmente, y proceder de diferentes fuentes ya que algunos son nutrientes o proceden de éstos y otros son productos del metabolismo. (Mataix y Battino, 2002).

En el organismo humano los radicales libres están controlados mediante un amplio espectro de antioxidantes de origen endógeno (enzimas antioxidantes, glutatión, albúmina, transferrina, ácido úrico, bilirrubina) y exógenos a través de la dieta (vitamina E y C, carotenoides, selenio, compuestos fenólicos). (Gutteridge, 1995).

2.1.6.3 Extracción de compuestos antioxidantes de los alimentos.

Los compuestos antioxidantes de los alimentos se extraen con disolventes de diferentes polaridades de acuerdo con el carácter hidrofílico o lipofílico de los compuestos que se desean evaluar. El disolvente más comúnmente utilizado en la obtención de extractos lipofílicos es el hexano.

Para la extracción de compuestos con carácter hidrofílico se han utilizado metanol, etanol, mezclas de etanol/agua, acetona/agua y metanol/agua así como extracción en medio ácido (pH=2) con metanol/agua, seguida de acetona/agua y agua/acetonitrilo en medio ácido, todos ellos ensayados en diferentes proporciones.

Asimismo, la presencia de compuestos no antioxidantes (ciertos aminoácidos y ácidos uránicos) en los extractos ensayados, también pueden afectar a estos resultados. Esto sugiere que la comparación de resultados sea solo llevada a cabo en muestras en las que se utiliza el mismo método y el mismo disolvente de extracción y que las sustancias interferentes deben ser comprobadas. (Pérez J. y col, 2006).

2.1.6.4 Pruebas utilizadas para detectar y cuantificar antioxidantes en extractos vegetales.

Para evaluar la actividad antioxidante de plantas y vegetales primero es necesario realizar una extracción de los compuestos presentes. Existen diversos métodos para obtener tales compuestos, desde una simple maceración hasta la utilización de fluidos súper críticos ultrasonido; se utilizan soluciones polares para extraer compuestos hidrófilos y solventes apolares para los compuestos hidrófobos (Rogalinski y col., 2004)

Entre las pruebas químicas que se utilizan para la detección y cuantificación de antioxidantes destacan las siguientes:

2.1.6.5 Métodos para determinar actividad antioxidante (ABTS Y DPPH).

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH (Arnao, M B, 2000). Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP) (Euskosk I, 2004), enzimática (peroxidase, mioglobulina), o también electroquímica.

Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico, y el DMPD solo en medio acuoso (Antolovich, M, 2002). El radical ABTS•+ tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm, y el DMPD a 505 nm (Fogliano V, 1999).

2.1.6.6 Atribución de los compuestos fenólicos en la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de dichas plantas se debe principalmente a compuestos no nutricionales que presentan una gran actividad biológica, tales como polifenoles, vitaminas y minerales (Khalaf y col., 2008). Entre los polifenoles mayormente encontrados en los materiales vegetales estudiados se encuentran los flavonoides, isoflavonas, flavonas, quercitina, catequinas, isocatequinas y colorantes como betalainas e indicaxantina (Cai y col., 2010).

La estructura molecular de los flavonoides consiste en un esqueleto de 15 átomos de carbono (C15). La estabilidad durante los procesos de extracción y purificación es debida a la alta resonancia que le confiere los anillos bencénicos; los flavonoides presentan una alta estabilidad molecular, soportando bajas y altas

temperaturas, hasta de 300°C. Pueden ser extraídos inicialmente con solventes orgánicos sin perder sus propiedades estructurales, y son muy estables al calor y a las reacciones de oxidación.

Las flavononas, flavonas y flavonoles son los flavonoides presentes en los cítricos. Aunque las flavonas y los compuesto de poder edulcorante igual o superior a la flavonoles se han encontrado en bajas concentraciones en comparación con las flavononas, han mostrado ser potentes antioxidantes, secuestradores de radicales libres o agentes que contribuyen a la acción anticancerígena y cardioprotectora, entre otras. (Cai y col., 2010).

Por su actividad antioxidante y sus excelentes funciones biológicas, algunos autores los refieren como sustitutos de los antioxidantes sintéticos existentes, pudiendo aportar beneficios tecnológicos, científicos, nutricionales y medicinales. La propiedad antioxidante de algunos flavonoides es determinada por la estructura o-dihidroxi en el anillo B, el 2,3 doble enlace en conjunción con la función 4-oxo y la presencia de ambos grupos hidroxilados en posición 3 y 5. (Kale y Adsule, 1995).

Las flavonas son las responsables del sabor amargo en los cítricos, siendo la naringina y la neohesperidina los componentes mayoritarios, (Mario M y col., 2004).

Se establece que el rendimiento en la extracción de los compuestos fenólicos y su actividad antioxidante no solo dependen de la naturaleza del disolvente y del método de extracción, sino también de los compuestos bioactivos y de la estructura de la matriz del producto, porque los extractos de polifenoles presentes en las plantas son una mezcla de diferentes clases de polifenoles, solubles en el sistema de solvente empleado. (Contini., 2008).

2.1.6.7 Beneficios que se obtienen de una dieta rica en polifenoles.

Son numerosos los estudios que han mostrado que los polifenoles poseen propiedades antioxidantes, inhibiendo la peroxidación lipídica y captando radicales

libres hidroxilo, supéroxido y alcoxi (Sichel et al., 1991). Protegen de la oxidación a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) desempeñando un papel clave en la prevención de la aterosclerosis. También pueden prevenir la trombosis, inhibiendo la agregación plaquetaria, la permeabilidad y fragilidad capilar (Mazza, 2000).

Son considerados reguladores del sistema inmune y como antiinflamatorios, probablemente debido a la modulación del metabolismo del ácido araquidónico, reduciendo los niveles de tromboxano. Hay que destacar el potencial anticarcinógeno, ya que pueden estimular el bombeo de ciertos agentes cancerígenos hacia el exterior de las células o bien activar a las enzimas de detoxificación (Mazza, 2000).

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS.

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos (DCTA) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en la colonia Buenavista, Municipio de Saltillo en el estado de Coahuila, México.

La metodología del presente trabajo se llevó a cabo en tres etapas que son definidas a continuación:

3.1.1 Etapa 1: Tratamiento térmico de la cascara de naranja y extracción de las fitomoléculas de interés por hidrodestilación.

3.1.1.1 Preparación de la materia prima.

Los residuos de cáscara fresca de naranja valencia fueron enviados de la juguera (POCITRUS, S.A de C.V), Prolongación Garizurieta S/N Col González, Álamo Temapache Veracruz, México.

Separación mecánica del subproducto

La cascara se sometió a un lavado en la cual se retiró el endocarpo quedando solo el exocarpo para un mejor manejo mecánico de este subproducto. Se realizaron cortes aproximadamente de 5mm x 5mm, para que el calor fuera uniforme a la hora del tratamiento térmico.



Figura 4. Preparación de la cascara de naranja para el tratamiento térmico.

Secado de la muestra por tratamiento térmico

El tratamiento térmico se llevó a cabo en una estufa con aire forzado, a una temperatura de 45 °C por 24 horas. Estuvo en monitoreo para que el aire de la estufa fuese uniforme en el área de exposición de la cascara.



Figura 5. Estufa con aire forzado (Yamato).

Trituración de la materia seca

Enseguida del secado, se sometió a un proceso de trituración con el molino para obtener características de tamaño de partícula homogéneo que permitió efficientizar la extracción de fitomoléculas de interés. (Ruiz G y Saavedra J,2007) Posteriormente la muestra se colocó en frascos de vidrio oscuros para proteger de la luz y a temperatura ambiente para su posterior uso.



Figura 6. Molino de pulverización (GE Commercial Motors).

3.1.1.2 Obtención de extractos de la cascara de naranja mediante tratamiento térmico (hidrodestilación).

Extracción de cáscara de naranja con etanol, etanol 50% y agua.

Las extracciones se realizaron por triplicado; utilizando cascara de naranja y un agente extractor en una relación 1:5 (p/v) por un tiempo de 3 horas y bajo las siguientes variables:

Tabla 3. Relación de variables durante la extracción.

Extracto		Etanol (ml)	Etanol-Agua 1:1 (mL)	Agua (ml)
Temperatura	75°C	100	50:50	100
	80°C	100	50:50	100



Figura 7. Equipo de hidrodestilación (González A, 2004).

Concentración de los extractos mediante separación al vacío (rotavapor).

Mediante un rotavapor se hizo la separación del solvente en las muestras, eliminado en su totalidad el solvente de los extractos. Las condiciones del rotavapor fueron una agitación de 100 rpm a una temperatura de 70°C que es la temperatura a la que empieza la ebullición del etanol sin llegar a la transformación de las fitomoléculas de interés.



Figura 8. Rotavapor (Yamato, Water Bath BM 400).

3.1.2 Etapa 2: Identificación, Conservación y Evaluación de la Actividad Antibacteriana de los extractos, etanólico, etanol 50% y acuoso contra bacterias patógenas.

3.1.2.1 Identificación macroscópicamente y microscópicamente de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Las cepas patógenas fueron donadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Saltillo, se realizó una identificación macroscópica y microscópica para asegurar que fuesen las bacterias patógenas indicadas.

La identificación macroscópica se llevó a cabo mediante la descripción del crecimiento en agar nutritivo de tres diferentes cepas de acuerdo a su forma, color, tamaño y características específicas.

Además se llevó a cabo la identificación microscópica mediante tinción de Gram para corroborar su forma y tinción mediante el uso de microscopio.



Figura 9. Microscopio (Labomed, Sumilab).

Conservación de bacterias patógenas

Las cepas de interés identificadas se hicieron crecer en caldo nutritivo a 32°C por 24 horas, para su conservación con un agente crioprotector (Leche descremada 10% y Glicerol 10%). En tubos Eppendorf se colocaron 500 mL del crioprotector y 500 mL del caldo nutritivo que contenía las cepas de interés, estas fueron almacenadas a una temperatura de -22°C en congelado.

3.1.2.2 Evaluación de la Actividad Antibacteriana de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Cultivo de bacterias patógenas

El cultivo de bacterias patógenas se realizó en cajas Petri con 15 milímetros de agar nutritivo, inoculando colonias de interés por el método de estría abierta cruzada, para su obtención.

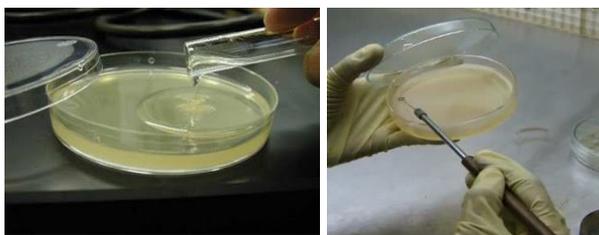


Figura 10. Cultivo de bacterias patógenas.

La siguiente tabla muestra la composición del medio agar nutritivo el cual fue esterilizado en autoclave a 121°C por 15 minutos y 1 libra de presión.

Tabla 4. Composición de Agar Nutritivo

Reactivo	g/ L
1. Peptona de carne	5
2. Extracto de carne	3
3. Agar bacteriológico	15

Fuente: MCD LAB. S.A. DE C.V.

Método de difusión de disco

Para este método se prepararon antibiogramas de la siguiente manera: Se cortaron discos de papel filtro de poro cerrado con un diámetro de 0.4 mm y un grosor de 1 mm, estos fueron sumergidos en tubos de ensayo por 15 minutos en los extractos obtenidos (etanólico, etanólico 50% y acuoso).

Posteriormente a la caja petri que contenía el agar nutritivo se le inoculó con asa bacteriológica por estriado abierto una colonia de las bacterias patógenas, después se introdujeron cuatro discos ya impregnados con el extracto sobre la placa de forma equidistante y se incubó a 32°C por 5 días.

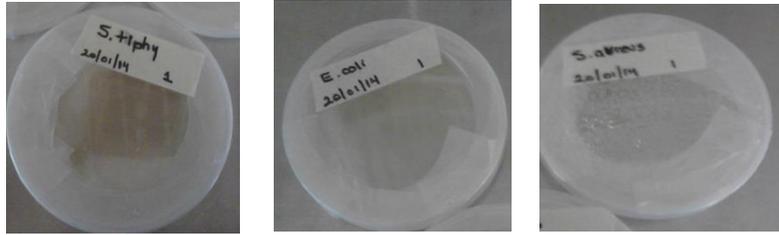


Figura 11. Antibiogramas contra *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Medida de halo de inhibición

Se midió el diámetro en milímetros de cada halo de inhibición con un Vernier, los seis extractos (M1-75°C, M2-80°C, M3-75°C, M4-80°C, M5-75°C y M6-80°C) fueron probados contra tres bacterias, estas pruebas se realizaron por triplicado. Los valores se registraron en una hoja de cálculo en Excel.



Salmonella typhi

Staphylococcus aureus

Escherichia coli

Figura 12. Halos de inhibición de bacterias patógenas por el método de difusión en disco

3.1.3 Etapa 3. Determinar la Actividad Antioxidante Mediante el Método ABTS y DPPH.

3.1.3.1 Evaluación de la Actividad Antioxidante mediante reducción DPPH en microplaca.

Fundamento

El radical 2,2-difenil-1-picril-hidrácil (DPPH) posee coloración morada, cuando encuentra un H^+ con el cual complementar su estructura pierde la coloración. El cambio de coloración es lo que permite cuantificar el poder antioxidante de la sustancia colocada como muestra.

Técnica:

Para conocer la actividad antioxidante mediante este método se preparó el radical DPPH a una concentración de 60 μM , en solución metanólica y se le determinó la longitud de onda de absorbancia del radical, mediante un barrido en el rango visible de 490 a 620 nm.

Se emplear como blanco de lectura solo metanol y como absorbancia control la de la solución DPPH-metanol.

El ensayo de actividad se hizo colocando 193 μL de solución DPPH-metanol y 7 μL de la muestra a analizar, se tapó con un papel aluminio para evitar el contacto directo con la luz hasta su lectura.

Se cuantificó el cambio de absorbancia de manera cinética y en los casos necesarios se realizaron diluciones de la muestra, donde la reacción de neutralización del radical fuera paulatina. Para graficar los datos el porcentaje de reducción del radical que se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ reducción de DPPH} = \frac{(A_c - A_m)}{A_c} * 100$$

Donde A_c es la absorbancia control (DPPH-metanol) y A_m es la absorbancia de la muestra.



Figura 13. Lector de Microplaca (Bio- Tek Instruments).

3.1.4 Evaluación de la Actividad Antioxidante mediante reducción ABTS.

Fundamento

El radical 2,2-azino bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) posee coloración azul, cuando encuentra un H^+ con el cual complementar su estructura pierde la coloración. El cambio de coloración es lo que permite cuantificar el poder

antioxidante de la sustancia colocada como muestra. Para la formación del radical ABTS es necesaria la presencia de persulfato de potasio.

Técnica:

Se preparó una solución de ABTS 7 mM y se mezcló con una solución de $K_2S_2O_8$ hasta que este último tenga una concentración de 2.45 mM. Se Dejó reposar en oscuridad por 12 h a temperatura ambiente hasta su uso.

Para muestras de alimentos y fenoles se diluye con etanol, hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 .

Para el ensayo se utilizó etanol como blanco de lectura y ABTS-etanol como absorbancia control; a una longitud de onda de 734 nm.

La mezcla de reacción fue de 1 mL de solución etanólica de ABTS y 10 μ L de muestra. Se dejó reaccionar 1 min y se leyó su absorbancia en el espectrofotómetro. Los resultados fueron expresados como porcentaje de reducción del radical que se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ reducción de ABTS} = \frac{(A_c - A_m)}{A_c} * 100$$

Donde A_c es la absorbancia control (ABTS-etanol) y A_m es la absorbancia de la muestra.



Figura 14. Espectrofotómetro.

4.1 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.1 Etapa 1: Tratamiento térmico de la cáscara de naranja y extracción de las fitomoléculas de interés por hidrodestilación.

4.1.1.1 Rendimiento de la materia prima.

Para obtener la cantidad de cáscara seca de naranja se optó por hacer los cálculos necesarios según la literatura. Tomando en cuenta que la humedad promedio de la cáscara es de 58.2%, el peso de cáscara seca se obtuvo según la siguiente fórmula:

$$\text{Peso de Cascara seca} = \text{Cascara fresca} - ((\text{cascara fresca} \times (58.2\%)) / (100))$$

Utilizando esta fórmula y sustituyendo nuestros valores en la misma el rendimiento en peso seco fue de 1.881 kg, según los cálculos realizados.

$$\text{Peso de Cascara seca} = 4.5 \text{ Kg} - ((4.5 \text{ Kg} \times (58.2\%)) / 100) = 1.881 \text{ kg}$$

Experimentalmente los valores reales de rendimiento de cascara seca fueron de 1.305 kg y haciendo una comparación de nuestro resultado real con el método reportado por (Reátegui L, 2005) podemos decir que existe una diferencia de 0.576 Kg, esta diferencia o valor obtenido posiblemente fue dado a que el tratamiento térmico afectó el porcentaje de humedad en nuestro experimento, a las diferencias de tiempos y condiciones del ensayo empleado por ellos; así como la naturaleza de la materia prima utilizada en nuestro trabajo.

Mostramos a continuación los cálculos obtenidos al final de nuestro trabajo para el rendimiento:

$$\% \text{ Rendimiento} = (\text{peso de muestra final} / \text{peso de muestra inicial}) \times (100)$$

$$\% \text{ Rendimiento} = (1.305 \text{ kg} / 4.5 \text{ kg}) \times (100)$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 29 \%$$

4.1.1.2 Extracción de fitomoléculas de la cáscara de naranja mediante tratamiento térmico (hidrodestilación).

Se trabajó con tres agentes extractantes: Etanol, etanol 50% y agua; mismos que fueron sometidos a dos diferentes temperaturas 75°C y 80°C.

La nomenclatura utilizada para los seis extractos obtenidos fue la siguiente: etanólico 50% (M1-75°C y M2-80°C), etanólico (M3-75°C y M4-80°C) y Acuoso (M5-75°C y M6-80°C) los cuales contenían las fitomoléculas de interés.

En la figura 15 se muestra la temperatura a la cual da inicio la extracción de fitomoléculas de interés en los diferentes tratamientos. Se regula la temperatura del calentador de tal modo que la temperatura del alcohol se encuentre en el rango de 70°C - 80°C, ayudándonos con el termómetro graduado, esto es debido a que si sobrepasamos los 80°C podríamos evaporar en demasía el alcohol y de este modo modificar el volumen de extracción.

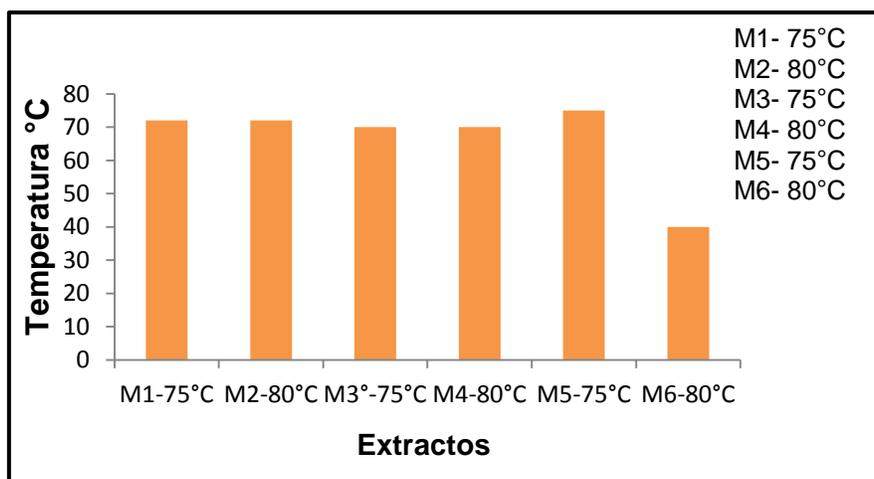


Figura 15. Temperatura a la cual empieza la extracción de cada muestra.

Todas las temperaturas máximas alcanzadas de los extractos son muy similares, excepto la M6-80°C, porque se manejó agua destilada que facilitó la velocidad de evaporización de la misma. Tener en cuenta que tanto la cantidad de alcohol

etílico como la de cáscara de naranja representaran las diferentes relaciones sólido / líquido.

En la figura 16 se muestra el tiempo que tarda el sistema en adaptarse al proceso de recuperación de fitomoléculas de interés presentes en los extractos, según la naturaleza del agente extractor y temperatura empleada.

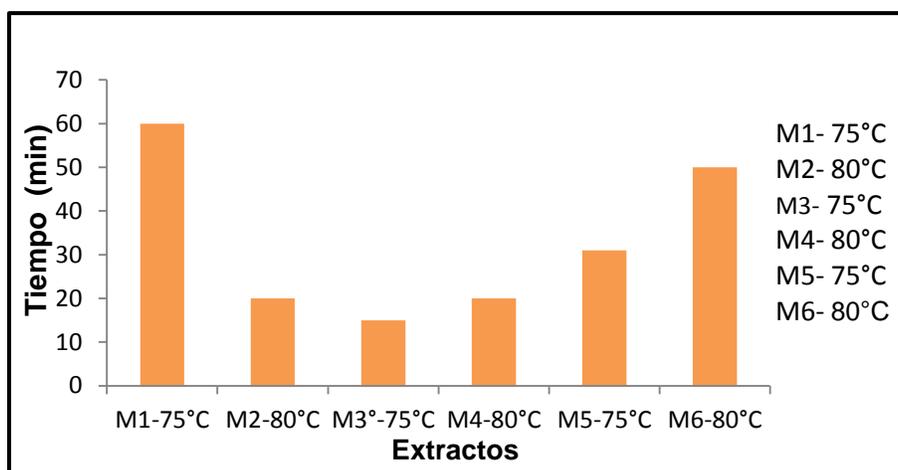


Figura 16. Tiempo de extracción a la cual los extractos inician su proceso de recuperación con los diferentes solventes y temperaturas.

Si analizamos la gráfica tiempo de extracción, sería fácil deducir que el tiempo óptimo de operación es aquel en el cual estos tienden a ser constantes, lo cual se conocería como “tiempo máximo de extracción”, pero este hecho no es del todo correcto, pues para poder hablar de tiempo máximo de extracción la gradiente de concentración para cualquier variación de tiempo tendría que ser cero y esto no ocurre, ya que por más saturado que esté el solvente siempre extraerá una pequeñísima cantidad de aceite que nunca llegara a ser cero.

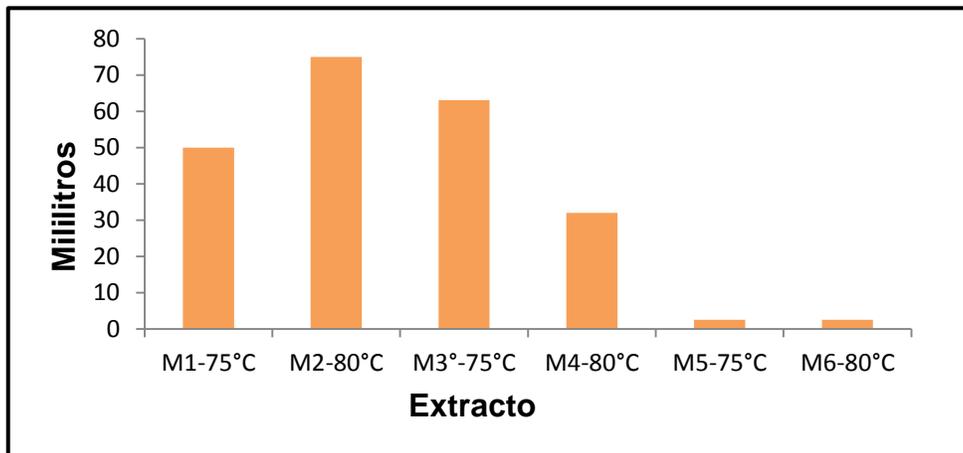


Figura 17. Cantidad recuperada de extracto con fitomoléculas de interés, en los diferentes agentes extractantes y sus temperaturas.

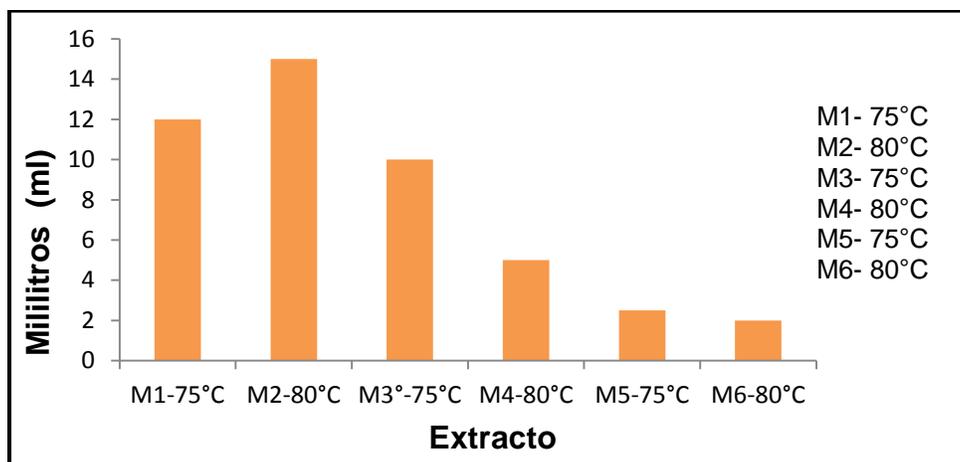


Figura 18. Cantidad total de extracto recuperado en la hidrodestilación con los diferentes solventes y temperaturas después del rotavapor.

En la Figura 18 se muestra la cantidad de extracto recuperado, donde después de las cantidades obtenidas en la hidrodestilación, fue necesario emplear un rotavapor para eliminar la mayor cantidad posible del solvente etanol, aclarando que solo fueron las primeras cuatro muestras.

Los solventes como el alcohol etílico entran en contacto con la cáscara de naranja y se producirá el proceso de transferencia de masa, en este caso será la extracción de aceite esencial de la cáscara que será reemplazado por el ingreso de alcohol que ingrese a los poros de la misma. En la figura 17 el extracto recuperado es mayor en las primeras cuatro muestras ya que el solvente acciona más rápido con la materia y esto hace mayor cantidad recuperada.

De dicho análisis se decide elegir al alcohol etílico de 96° QP debido a sus propiedades como lo muestra el cuadro, entre ellas, su capacidad de solubilizar y extraer los componentes principales del aceite esencial como los compuestos oxigenados y en menor cantidad a los terpenos y sesquiterpenos, los cuales al ser demasiado inestables se oxidan fácilmente tendiendo a enranciar al aceite esencial y a la vez a que este presente una apariencia turbida, pudiendo afectar las lecturas de la concentración. Es por esta razón, que la extracción de aceites esenciales mediante solventes cuenta con etapas posteriores de desterpenización.

De tales datos se observa que no necesariamente mientras se aumente el diámetro de partícula la concentración deba disminuir, puesto que aquí entra a tallar otro factor importante como lo es la geometría de la partícula. Esta es determinante para la obtención de altas concentraciones de aceite, pues mientras la geometría permita mantener en mayor contacto al solvente con el aceite, mayor será la extracción, independientemente de cuanto sea el diámetro de la partícula.

En la figura 18 podemos observar la cantidad total de extracto obtenido después del proceso de rotavapor y su concentración final en mililitros (ml); cabe mencionar que las muestras extraídas con agua no fueron sometidas a este proceso.

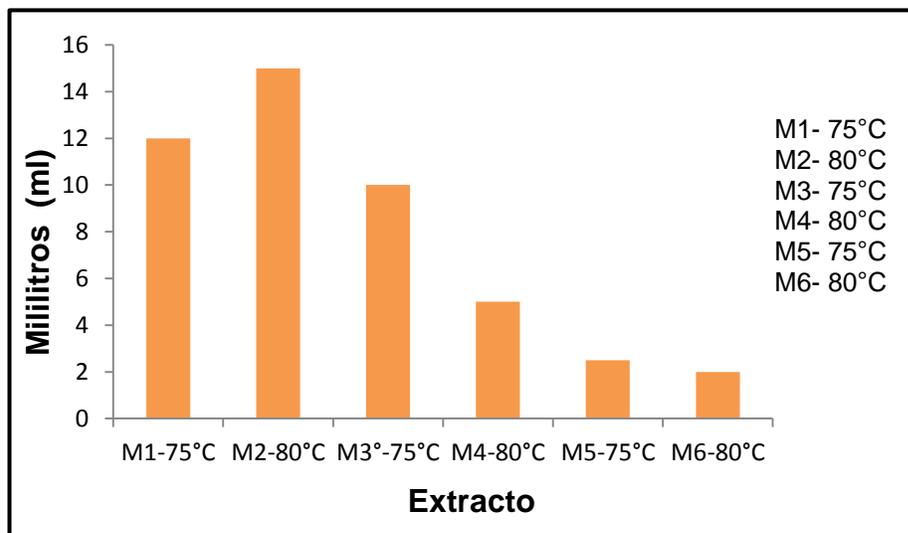


Figura 19. Cantidad de etanol recuperado.

El etanol recuperado fue mayor en la muestra 2, debido a que la temperatura alta evaporó y condensó el solvente (etanol) por tener un punto de ebullición más bajo en comparación con los otros agentes extractantes.

Con respecto al solvente utilizado, la elección se realizó mediante un análisis comparativo de un grupo de tres solventes, tomando como referencia las consideraciones descritas en la tabla adjunta. Cabe resaltar que el aceite esencial de la naranja es una mezcla de varios componentes como los terpenos (Form. general: $C_{10}H_{16}$), sesquiterpenos, (Form. general: $C_{15}H_{24}$), alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos y ésteres.

Tabla 5. Diferentes solventes etanólicos más usados en procesos de hidrodestilación.

Características del solvente	Alcohol etílico	Éter de petróleo	Ciclo hexano
1. polaridad	Molécula polar	Molécula parcialmente polar	Molécula no polar
2. peso molecular(g/mol)	46	87-114	84.2
3. punto de ebullición	78.5	20-70	81
4. selectividad	Extraerá principalmente los componentes oxigenados, los cuales son los portadores del sabor y aroma de los aceites esenciales como son: alcoholes, aldehídos, esteros, cetonas y fenoles.	Extraerá mayor cantidad de terpenos y sesquiterpenos, además de parte de los compuestos oxigenados.	No extraerán componentes principales de los aceites esenciales
5. Recuperación	Separación mediante calentamiento y posterior condensación	Separación mediante calentamiento y posterior condensación	Separación mediante calentamiento y posterior condensación
6. Inflamación	Elevada	elevada	elevada

Los extractos obtenidos como lo reporta (Reátegui, 2005), deben tener las siguientes características físicas. El aceite esencial de naranja es ligeramente amarillento de olor característico a naranjas, mientras que su sabor es ligeramente amargo.



Figura 20. Extractos obtenidos del experimento.

4.1.2 Etapa 2: Identificación, conservación y evaluación antibacteriana de los extractos etanólicos, etanol 50% y acuosos contra *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

4.1.2.1 Identificación macroscópicamente y microscópicamente.

La observación macroscópica y microscópica corresponde a la literatura mencionada. Se obtuvo como resultado el crecimiento de las tres bacterias patógenas sembradas en Agar Nutritivo por el método de estría abierta cruzada, técnica que permite que los microorganismos crezcan en forma de colonias individuales logrando un crecimiento esperado y su conservación realizada manejando glicerol a una concentración del 10 % o bien como describe el (Departamento de bioquímica y biología molecular y celular, Universidad de Zaragoza, 2004) se puede utilizar el 20 % logrando su conservación por meses.

Tabla 6. Identificación microscópica.

Bacteria patógena	Clasificación	Forma
<i>Escherichia coli</i>	Gram (-)	Bacilo
<i>Salmonella typhi</i>	Gram (-)	Bacilo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram (+)	cocos



Figura 21. Bacterias patógenas observadas mediante el microscopio.

4.1.3 Cultivo de bacterias patógenas.

Se obtuvo un abundante crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*, en el medio de cultivo agar nutritivo en un tiempo de 24 horas, esto depende de que el medio de crecimiento existen carbohidratos como fuente de carbono, ácido orgánicos y aminoácidos como sustratos, en condiciones aerobias. La presencia de gas, azúcares y ácido pirúvico son productos clave para el diagnóstico de estos microorganismos (Pachón 2009).

La cantidad total fue de 6 extractos aplicados con tres diferentes bacterias patógenas, cajas de medio agar nutritivo con crecimiento de colonias: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*. De las cuales se seleccionaron para ser usados en los antibiogramas preparadas.

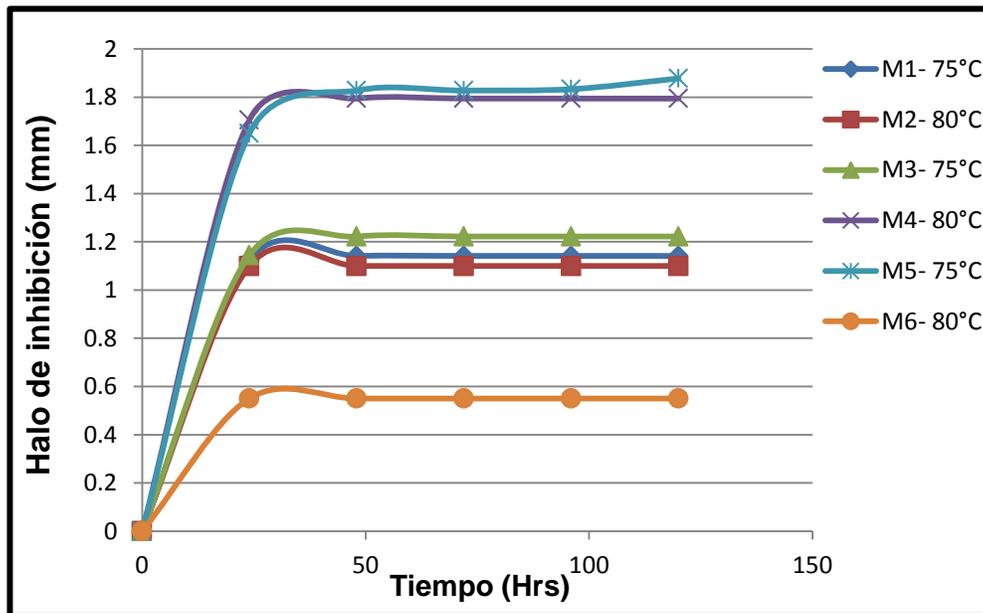


Figura 22. Actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*.

Respecto a las M1 Y M2 el halo de inhibición es muy similar existiendo diferencia de 3.8 mm, esto es porque la extracción fue relación de etanol-agua destilada, además el manejo de las temperaturas fue similar; M1 existiendo una inhibición promedio de 11.3833 y M2 con un promedio de 11 mm. Esto quiere decir que la bacteria *S. aureus* si presentó una inhibición a partir de las 24 horas en la que después de 120 horas se mantuvo estable.

En las M3 Y M4 si existe una diferencia de 5.7 mm, esto es posible a que en los extractos obtenidos de M3 es menor que la M4, ya que en estos la extracción fue con etanol, esto se debe a que el etanol arrastro los compuestos causantes de la inhibición. M3 presenta un promedio de 12.066 mm, y M4 17.7666 mm de halo de inhibición. Esto quiere decir que a una temperatura de 80°C hay mejores resultados. La bacteria *S. aureus* presentó mayor sensibilidad después de las 24 horas, después de este tiempo la inhibición aumento de 0.8 mm manteniéndose constante hasta las 120 horas.

En la M5 Y M6, si existe una gran diferencia en cuanto a la inhibición, de 12.5, en la M5 la temperatura fue de 75°C que resulto mejor como inhibición frente a *S. aureus*. M6 posiblemente los compuestos fueron afectados por la temperatura de

80°C. El halo de inhibición de la bacteria no presentó cambios en el lapso de monitoreo.

El *S. aureus* presenta mayor sensibilización al extracto etanólico a una temperatura de 80°C y el extracto M6 (agua destilada) a una temperatura de 75°C,

En la primera porque el solvente arrastra más compuestos que permiten a la bacteria ser menos resistente, según lo reportado por Tavares 2000, existen mecanismos de resistencia por parte de *S. aureus* que están relacionados con la activación de una síntesis de la pared celular, con hiperproducción de proteínas ligadoras de penicilina. Este puede ser uno de los factores que influyen en la no inhibición de los extractos frente a este microorganismo. (Al-fatimi et al., 2007).

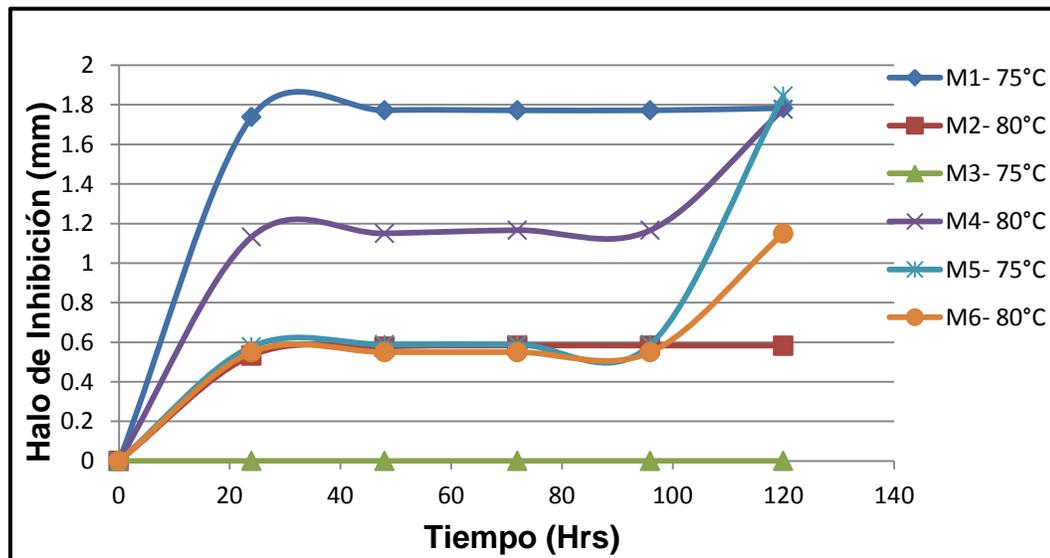


Figura 23. Actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*.

M1 Y M2; existe una diferencia de inhibición de 11.95 mm, M1 el resultado es mayor que en M2, el efecto inhibitorio fue estable después de las 24 horas al igual que en la M2, la temperatura de 75°C fue mejor en la M1.

M3 Y M4; existe una inhibición nula en la M3, a diferencia de la otra que tuvo un resultado de 12.78 mm. y una temperatura de 80°C, la bacteria *E. coli* después de las 100 horas es más sensible al extracto.

M5 Y M6; en estos extractos que fueron con agua destilada la diferencia no fue tan alejada del halo de inhibición de las mismas, la bacteria *Escherichia coli* aumenta la sensibilidad después de las 100 horas.

La resistencia de *E. coli* frente a las sustancias antibacterianas está relacionada con la superficie hidrológica de su membrana externa. Esta membrana, rica en moléculas de lipopolisacaridos, despliega una barrera contra la penetración de numerosas moléculas antibióticas y está también asociada con las enzimas en el espacio periplasmático, las cuales son capaces de romper las moléculas introducidas desde el exterior.

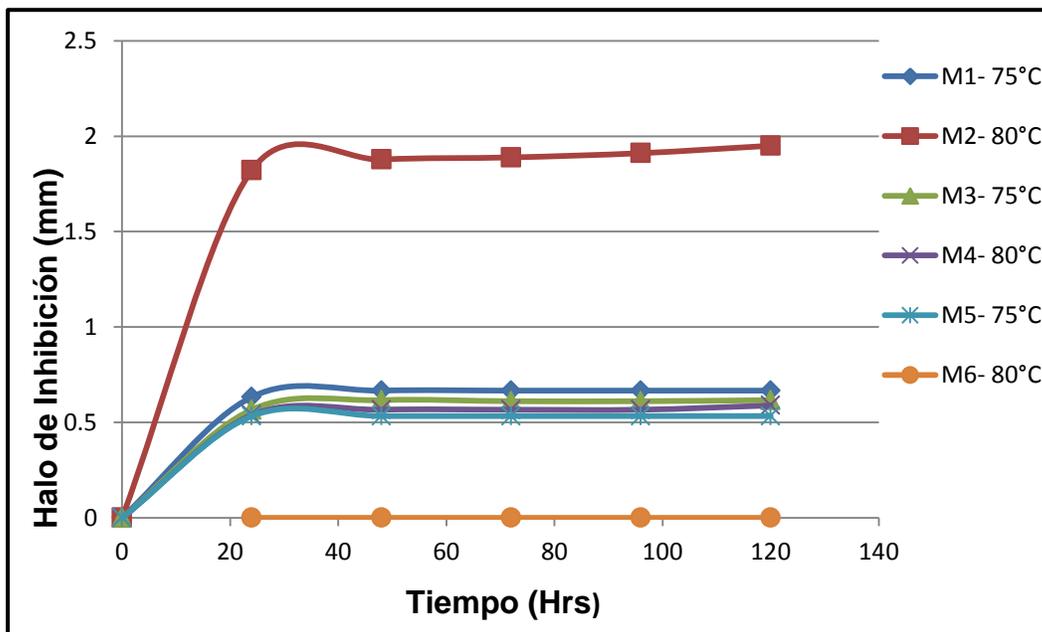


Figura 24. Actividad antibacteriana contra *Salmonella typhi*.

M1 y M2; entre estas muestras existe una diferencia de 12.3 mm, siendo la M2 que presento mayor halo de inhibición, se aprecia fácilmente que este extracto está muy alejado de los demás. La bacteria *Salmonella typhi* se mantiene constante después de las 24 horas.

M3 Y M4; no hay una diferencia mayor entre los mismos extractos, la bacteria se comporta uniforme.

M5 Y M6; existe una diferencia total ya que en la M6 la inhibición fue nula.

El extracto etanólico a una temperatura de 80°C, contra la bacteria *S. typhi* presento mayor sensibilidad notoria con respecto a las demás.

4.1.4 Etapa 3: Determinar la actividad antioxidante mediante 2 métodos (ABTS Y DPPH), de los extractos; etanol 50%, etanol y acuoso.

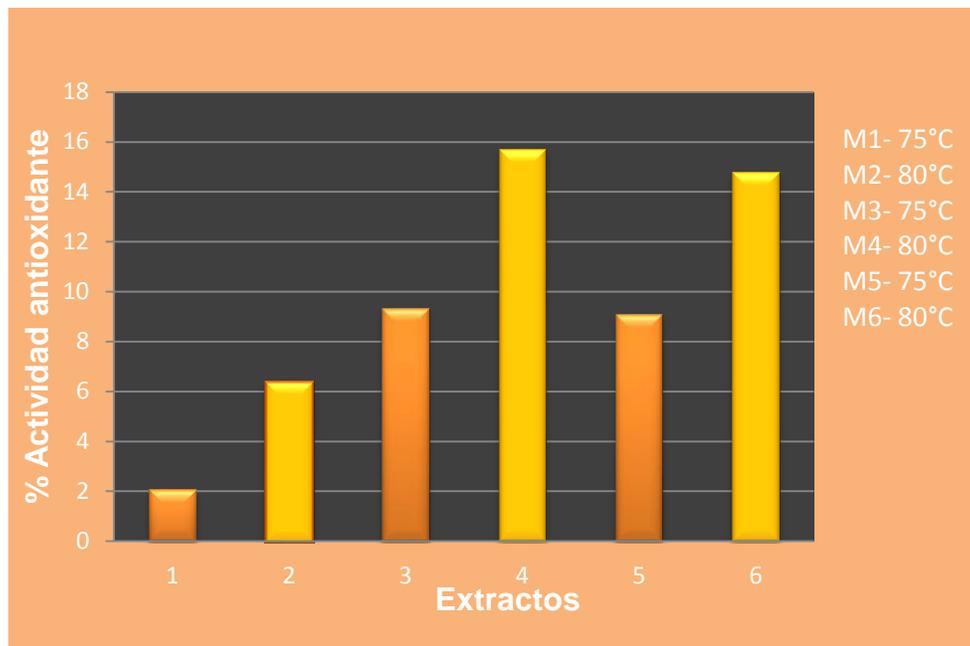


Figura 25. Actividad antioxidante (DPPH)

En esta tabla observamos que los 6 extractos tiene la propiedad de tener actividad antioxidante, siendo la M4 Y M6 con mayor, esto es a que en estos tratamientos los compuestos terpenicos se lograron conservar en estos, dando como resultado que la actividad antimicrobiana no está muy ligada a la actividad antioxidante.

En este método hay una mejor captación de radicales libres de los extractos, y no es dependiente de la concentración como lo mencionan algunos autores (Kuskoski M et al., 2005).

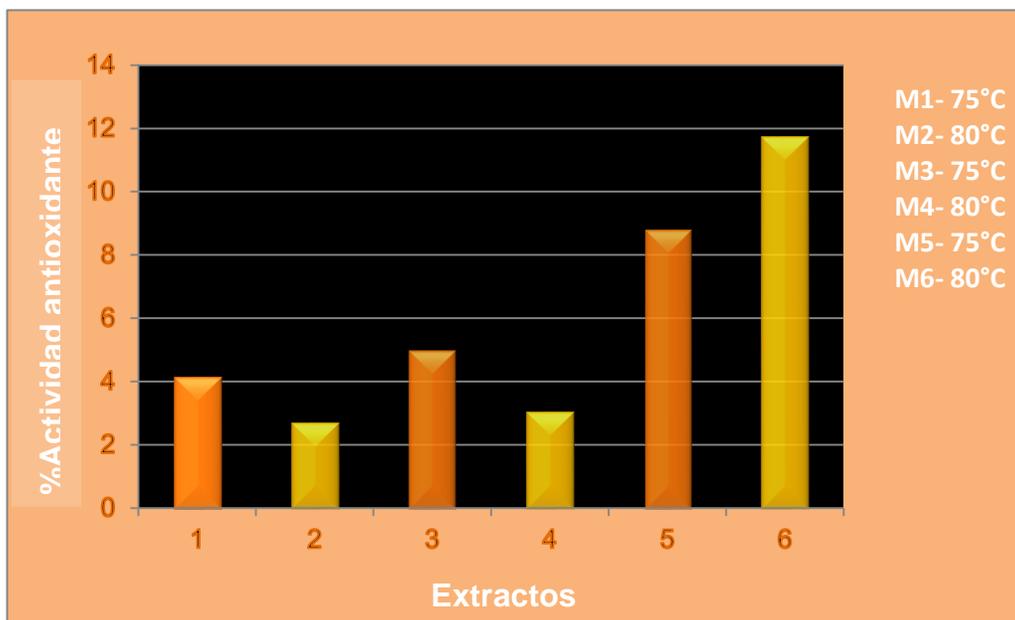


Figura 26. Actividad antioxidante (ABTS)

Con este método la actividad antioxidante de los extractos la inestabilidad es muy marcada en la M1, M2, M3, M4, excepto en la M5 Y M6, en la que la captación de radicales es mucho mayor, estos tratamientos son muy semejantes en cuanto a la temperatura aplicada, lo que quiere decir que si hubo conservación de los componentes como los fenoles para dicha actividad.

5.1 CONCLUSIONES

El mejor método de extracción fue la M1-75°C Y M2-80°C, ya que se obtuvo mejor cantidad de extracto, esto puede ser atribuido en la actividad antibacteriana en bacterias Gram negativas.

La bacteria *Staphylococcus aureus* presentan un halo de inhibición muy similar, en cuanto a un extracto de los 6 comparados. El promedio máximo de inhibición de la M5- 75°C es de 18 mm de inhibición. Esto es a que la bacteria por ser una Gram positivas es más sensible a los 6 extractos, ya que en su monitoreo se presentó muy uniforme después de las 24 horas.

La bacteria *Escherichia coli*, presenta mayor promedio de halo de inhibición en la M1- 75°C con un diámetro de 12.6 mm, la sensibilidad de la bacteria mostro ser no tan uniforme en cuanto al tiempo de la inhibición.

La bacteria *Staphylococcus aureus* presento una gran diferencia de halo de inhibición con respecto a las demás muestras, la que mayor obtuvo fue un promedio de 18.9 en la M2-80°C.

Haciendo estas comparaciones las M1-75°C Y M2-80°C, funcionan mejor como antibacteriano en los extractos etanol 50%, y las dos pertenecen a Gram negativas.

Respecto a la actividad antioxidante es mejor en las M5-75°C Y M6-80°C, pudiendo ser que los compuestos fenólicos son menos dañados con estos métodos de extracción.

Por último, la actividad antimicrobiana de los extractos no resulto ser tan favorable como lo esperado, por el tratamiento térmico inicial de la cáscara de naranja valencia, es por eso que muchas investigaciones manejan las extracciones en fresco, para obtener mejores rendimientos, y por consiguiente mejor actividad antibacteriana y antioxidante.

6.1 RECOMENDACIONES

Manejar la cáscara de naranja en fresco usando los mismos métodos de extracción de aceites esenciales.

También manejar los tamaños de partícula menores a 6 mm, como lo establecen algunos autores, para obtener un mejor rendimiento de aceites esenciales.

En caso de la M5-75° Y M6-80 °C, que fueron por hidrodestilación someterlo a una separación de agua con sulfato de sodio anhidro.

7.1 BIBLIOGRAFIA

1. Aguirre Joya. Obtención de una bebida alcohólica tipo tequila con actividad antioxidante por adicción de extractos de cáscara de frutas. Septiembre 2013.
2. Albayrak S, Aksony A, Sagdic O, Hamzaoglu E. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. 2010.
3. Alberto M, Rinsdahl M, Manca M. Antimicrobial effect of polyphenols from Apple skins on human bacterial pathogens. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2006.
4. Albornoz A. Productos naturales, sustancias y drogas extraídas de las plantas. Facultad de ciencias universidad central de Venezuela caracas Venezuela, 1980.
5. Alexandre Espachs - Barroso, Robert C. Soliva - Fortuny and Olga Martín-Belloso. A natural clouding agent from orange peels obtained using polygalacturonase and cellulase, *Food Chemistry*, ISSN 0308–8146, 92(1), 55-61, 2005.
6. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel, *Journal of Chromatography A*, ISSN 0021 9673, 11(12), 121- 126, 2006.
Al-Reza, Atiqur Rahman & Sun Chul Kang Department of Biotechnology, Daegu University, Kyongsan, Kyounbook 712-714, Korea, 2009.
7. Ángela Andrea Gonzalez Villa universidad nacional de Colombia sede manizales departamento de ingeniería química. Antimicrobial resistance mechanisms in respiratory pathogens, 2004.
8. Arnous, A. Makris, D. Kefalas, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J. Food Comp*. 2002.

9. Badui S. química de los alimentos 3° ed. Logman Alhambra. Mexico DF, mexico 645 p. Biomédica, vol.25, num.4, 2005.
10. C. Blanco Tirado E.E Stashenko, M.Y. Combarizada and J.R. Martinez. (1995). Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolutions gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry.
11. Cabra Rojas E (1988). Los Aceites Esenciales, Panorama Internacional y del Mercado Colombiano. Tecnología, 175 (5): 55-60.
12. Catherine Argyropoulou, Dimitra Daferera, Petros A. Tarantilis, Costas Fassekas and Moschos Polissiou. Chemical Composition of the essential oil from leaves of *Lippia Citriodora* H.B.K (verbenaceae) at two developmental stages, biochemical systematics and ecology, 2007.
13. Contini M, Baccelloni S, Massantini R, Anelli G. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. Food Chem. 2008 Oct 1; 110 (3): 659 – 669.
14. Dabbah, R. V.M. Edwards y W.A. Motas. Antimicrobial Activity of Some Citrus Fruits Oils on Selected Food-Borne Bacteria. Appl. Microbiology. 19 (1): 27-31, 1970.
15. Diana C. Corzo Barragán , Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico, Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 2012.
16. Díaz J. A. (2002). Análisis del mercado internacional de aceites esenciales y aceites vegetales. Instituto Alexander Von Humboldt-Biocomercio Sostenible. Bogotá.
17. Fogliano, V. VerdE, V; Randazzo, G; Ritieni, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. J. Agric. Food Chem. 47, 1035-1040, Grosse R. Et al (2000). Extracción del Aceite Esencial de Naranja Cajera citrus. Acta Científica Venezolana 51(2), 200-208.
18. García Peña. Evaluación de la acción antimicrobiana de bacteriocinas aisladas a partir de bacterias lácticas. Diciembre 2012.

19. Ivonne Cerón-Salazar, Carlos Cardona-Alzate Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de la cáscara de naranja Ingeniería y Ciencia, vol. 7, núm. 13, 2011.
20. Juan Felipe Barreto. Efectos antimicrobianos del diente de león (*Taxaxacum officinale* y el gualanday (*jacaranda obtusifolia*) sobre *staphylococcus aureus* y *pseudomonas aureginosa* causantes de enfermedades del apiel. Carrerra bacteriologia. Facultad de ciencias basicas. pontificia Universidad javeriana,1997.
21. Kale P.N, Adsule P.G. En Salunkle DK, Kadam,SS (Eds.) Handbook of fruits science ans technology; Production, Composition, Storage and Processing,1995.
22. Lizcano, A y Vergara, J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos o aceites esenciales de las especies vegetales valeriana pilosa, hesperomeles ferruginea, myrcienthes rhopaloides y pasiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos.2007.
23. Limber Reátegui Díaz, Hidroextracción y fraccionamiento del aceite esencial de cascara de naranja,2005.
24. M. del rosario Pascual y Vicente calderón y pascual 2000), microbiología alimentaria 2ªEdicion 2000.
25. Mario José Moreno Álvarez, Douglas Rafael Belén Camacho, María Paola Sánchez, miguel Viloría matos, David García. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flavonoides de cascara de naranja en el aceite de soja desodorizado,2004)
26. Martín, JA Siles ,AF Chica , A. Martín Mariano Cerutti, Fernando Neumayer Introducción a la obtención de aceite esencial de limón Invenio, vol. 7, núm. 12, junio, 2004.
27. Moure A, Cruz J, Franco D, Domínguez J, Sineiro J, Domínguez H, et al. Natural antioxidants from residual sources. Food Chem. 2001.

28. Nychas, G. J.E., Tassou, C.C. & Skandamis, P. Antimicrobials from herbs and spices. In: Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods (edited by S.M. Roller), 2003.
29. Pérez-Jimenez, J y Saura-Calixto, F; (2006) Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. Food Research internacional, 39, 791-800.
30. Prieto J, García del Potro M, Gómez-Lus ML. Guía para el uso de antibióticos en Atención Primaria. En: Eficacia in vivo, Eficacia in vitro. Madrid-Barcelona. Ed Doyma S.A. 1997; 83-96.
31. Raybaudi-Massilia, R.M., J. Mosqueda-Melgar, R. SolivaFortuny, O. Martín-Belloso (2009), Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruit juices by traditional and Alternative Natural Antimicrobial, Comprehensive Review in food Science and food safety.
32. Rueda Yáñez; Mancilla Lugo; otros. "Estudio del aceite esencial de la cáscara de naranja dulce (citrus sinensis, variedad Valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander, Colombia)". Bistua. Vol 5.1. Pag 3-8. Colombia, 2007
33. Weiss E A (1997). Essential Oil Crops. Cab International: New York, USA, pp. 417-511.

8.1 ANEXO

8.1.1 Tinción de Gram.

Esta tinción se denominada así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, Gram positivas y Gram negativas.

Descrita en forma breve, la secuencia de la tinción es la siguiente:

- 1.- Frotis fijado con calor se tiñe 1 min con Violeta Cristal, se lava con agua.
- 2.- Se cubre con solución Yodada durante 1 - 2 min. y se lava de nuevo con agua.
- 3.- Decolorar con mezcla alcohol etílico/acetona.
- 4.- Escurrir y cubrir con Safranina (color de contraste) durante 1 – 2 min. Lavar y secar.

Material

- Colonias de bacterias patógenas
- Solución cristal violeta
- Solución Lugol
- Solución alcohol cetona
- Solución safranina

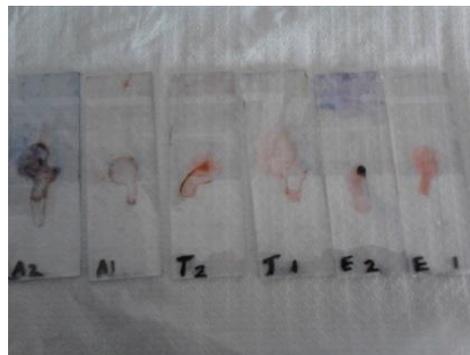


Figura 27. Tinción de Gram.