



**UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**

**TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TITULO DE
INGENIEROS AGROINDUSTRIALES**

TEMA:

**“APLICACION DE ACEITES ESENCIALES DE CORTEZAS DE LIMON SUTIL
(*Citrus Aurantifolia Swingle*) Y RUGOSO (*Citrus Jambhiri*) COMO
INHIBIDORES DE CRECIMIENTO PATOGENOS *E.COLI* Y *SALMONELLA*”**

AUTORES:

**GUALE CABAL ARIEL ANDERSON
MIELES BURGOS JAISON DUSTIN**

TUTOR:

ING. MARÍA ISABEL MANTUANO CUSME, Mg

MANTA - MANABI – ECUADOR

2020

UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIEROS AGROINDUSTRIALES**

**“APLICACION DE ACEITES ESENCIALES DE CORTEZAS DE LIMON SUTIL
(*Citrus Aurantifolia Swingle*) Y RUGOSO (*Citrus Jambhiri*) COMO
INHIBIDORES DE CRECIMIENTO PATOGENOS *E.COLI* Y *SALMONELLA*”**

Sometida a consideración del Honorable Consejo Directivo de la Facultad de
Ciencias Agropecuarias como requisito para obtener el Título de **INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

Aprobado por el tribunal:

Ing. Robert Mero Santana, Mg
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Christian Rivadeneira Mg.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Mirabella Lucas Ormaza, Mg
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

En calidad de docente tutor(a) de la Facultad de CIENCIAS AGROPECUARIAS de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, certifico:

Haber dirigido y revisado el trabajo de titulación, cumpliendo el total de 400 horas, bajo la modalidad de tesis, cuyo tema del proyecto es “**Aplicación de aceites esenciales de cortezas de limón sutil (*Citrus Aurantifolia Swingle*) y rugoso (*Citrus Jambhiri*) como inhibidores de crecimiento patógenos *E.coli* y *Salmonella*”, el mismo que ha sido desarrollado de acuerdo a los lineamientos internos de la modalidad en mención y en apego al cumplimiento de los requisitos exigidos por el Reglamento de Régimen Académico, por tal motivo CERTIFICO, que el mencionado proyecto reúne los méritos académicos, científicos y formales, suficientes para ser sometido a la evaluación del tribunal de titulación que designe la autoridad competente.**

La autoría del tema desarrollado, corresponde al señor **Ariel Anderson Guale Cabal**, y el señor **Jaison Dustin Mieles Burgos**, estudiante de la carrera de **Ingeniería Agroindustrial**, período académico 2019-2020, quienes se encuentran aptos para la sustentación de su trabajo de titulación.

Particular que certifico para los fines consiguientes, salvo disposición de Ley en contrario.

Manta, 20 de Diciembre de 2019.

Lo certifico,

Ing. MARIA ISABEL MANTUANO CUSME Mg.

Docente Tutor(a)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Nosotros los alumnos egresados ARIEL ANDERSON GUALE CABAL con C.I. 131492864-7 y JAISON DUSTIN MIELES BURGOS con C.I. 131331191-0 de la facultad de Agroindustrias, declaramos de forma libre y voluntaria que el trabajo, **Aplicación de aceites esenciales de cortezas de limón sutil (*Citrus Aurantifolia Swingle*) y rugoso (*Citrus Jambhiri*) como inhibidores de crecimiento patógenos *E.coli* y *Salmonella***, y las expresiones vertidas son autoría de los abajo firmantes y que se han realizado las correspondientes investigaciones en base a la bibliografía datos en internet y revistas científicas. En consecuencia, asumimos la responsabilidad de la originalidad de la misma que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se han respetado las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

DUSTIN MIELES BURGOS

ARIEL GUALE CABAL

AGRADECIMIENTO

A Dios y a nuestros padres por su amor y apoyo incondicional, por los sacrificios que tuvieron que hacer a lo largo de todo nuestro proceso estudiantil siendo motivación para la culminación de nuestra carrera y sobre todo por confiar en nosotros en cada momento.

A la Ing. María Isabel Mantuano Mg, nuestra tutora y amiga, por guiarnos en el desarrollo de esta investigación, por brindarnos su apoyo absoluto y porque es un ejemplo que seguir en nuestra carrera, lo cual nos lo demostró tanto como docente y como amiga.

Al personal de los laboratorios de la facultad quienes nos brindaron su apoyo para la realización experimental del presente trabajo.

A nuestros hermanos y demás familiares que siempre nos brindaron su apoyo y sobre todo creyeron en nosotros.

A nuestros amigos que también fueron participe para la realización de este trabajo.

Mil gracias a todos.

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedicamos a nuestras familias que gracias a su apoyo pudimos culminar nuestra carrera.

A nuestros padres por su apoyo incondicional para cumplir con los objetivos trazados como persona y estudiantes.

A nuestros hermanos y amigos cercanos por estar siempre apoyándonos.

A nuestra tutora la Ing. María Isabel Mantuano Mg., por la oportunidad que nos brindó y los consejos para seguir adelante con nuestras metas.

RESUMEN

El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo determinar el rendimiento de dos métodos de extracción de aceite esencial de dos variedades de cascara de limón, sutil (*Citrus Aurantifolia*) y rugoso (*Citrus Jambhiri*), se realizó el análisis de las características físico-químicas de los aceites esenciales, así mismo se hizo la comparación del poder inhibitorio de los aceites extraídos frente las bacterias *E.coli* y *Salmonella spp.* Para determinar la actividad antimicrobiana se empleó el método de difusión de discos en agar donde se utilizaron concentraciones de aceite esencial al 60% y 90 %, para lograr las concentraciones se utilizó tween 80 para diluir los aceites esenciales, concluyendo que las concentraciones que presentaron mayor efecto inhibitorio fueron al 60% para ambas variedades de aceite, con un poder de inhibición de 14.33 mm en el limón sutil y 12.67 mm en el limón rugoso frente *Salmonella spp.*, la respuesta inhibitoria frente *E. coli* fueron de 15.00 mm en el limón sutil y 12.44 en el limón rugoso.

Palabras claves: aceites esenciales, tween 80, poder inhibitorio, *E.coli*, *Salmonella spp.*, limón rugoso, limón sutil.

SUMMARY

The objective of this research project was to determine the performance of two methods of extracting essential oil from two varieties of lemon peel, subtle (*Citrus Aurantifolia*) and rough (*Citrus Jambhiri*), the analysis of the physical-chemical characteristics of The essential oils were also compared with the inhibitory power of the oils extracted against *E.coli* and *Salmonella spp.* To determine the antimicrobial activity, the method of diffusion of discs in agar was used where concentrations of 60% and 90% essential oil were used, to achieve the concentrations tween 80 was used to dilute the essential oils, concluding that the concentrations that presented the highest Inhibitory effect was 60% for both varieties of oil, with an inhibition power of 14.33 mm in the subtle lemon and 12.67 mm in the rough lemon against *Salmonella spp.*, the inhibitory response against *E. coli* was 15.00 mm in the subtle lemon and 12.44 in the rough lemon.

Keywords: essential oils, tween 80, inhibitory power, *E.coli*, *Salmonella spp.*, rough lemon, subtle lemon.

INDICE

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 MARCO TEÓRICO.....	2
1.2.1 Origen del Limón	2
1.2.2 Descripción Botánica	2
1.2.3 Composición y Propiedades	2
1.3.1 Aceite De Esencial De Cítricos Como Bactericida.....	6
1.3.2 Solventes usados para concentraciones de Aceites esenciales.....	6
1.4 PLANTAMIENTO DE PROBLEMA	7
1.5 JUSTIFICACIÓN.....	7
1.7 OBJETIVOS.....	8
1.7.1 OBJETIVO GENERAL.....	8
1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8

CAPITULO II

2.1.-METODOLOGÍA	9
2.2.1.- Factor De Estudio.....	9
2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	10
2.3.1.- Tipo de Diseño.....	10
2.3.2.- Análisis Estadístico.....	10
2.4.- TRATAMIENTOS.....	12
2.5 MANEJO DEL EXPERIMENTO	13
2.6.- METODOS DE ANALISIS.....	13
2.6.1.- Extracción de aceite en destilación por arrastre de vapor	13
2.6.2.- Extracción Continua En Soxhlet	14
2.6.3.- Porcentaje De Rendimiento De Aceite Esencial.....	14
2.6.4.-Determinación de la Densidad.....	15
2.6.5.- Determinación Del Índice De Refracción	15
2.6.6.- Solubilidad En Etanol.....	15
2.6.7.-Determinación Del Índice De Acidez	16
2.6.8.- Elaboración de las Concentraciones del Aceite Esencial	16
2.6.9.- Actividad Antimicrobiana (Método De Difusión De Discos En Agar	16

CAPITULO III

3.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
---------------------------------	----

CAPITULO IV

CONCLUSIONES	23
4.2 Recomendaciones	24
BIBLIOGRAFIA	25
ANEXOS	30

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1 Análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental N°1	11
Tabla N°2: Análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental N°2.....	11
Tabla N°3. Tratamientos de estudio del diseño experimental 1	12
Tabla N°4. Tratamientos de estudio del diseño experimental 2.....	12
Tabla N°5.- Porcentaje de rendimiento por extracción por destilación de arrastre de vapor.....	17
Tabla N°6.- Densidad De Aceites Esenciales De Las Dos Variedades De Cascara De Limón.....	18
Tabla N°7.- medidas de índice de refracción de las muestras de aceite esencial.....	19
Tabla N° 8.- índice de acides de aceites esenciales.....	20
Tabla N°9.- Halos de inhibición de las concentraciones de aceites esenciales de cascara de limón sutil y rugoso frente a la bacteria <i>Echerichia coli</i>	21
Tabla N°10.- Halos de inhibición de las concentraciones de aceites esenciales de cascara de limón sutil y rugoso frente a la bacteria <i>Salmonella spp.</i>	22

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Actualmente la fruta del limón (*Citrus spp*) es usada en su gran porcentaje por la industria alimenticia para la extracción del zumo, también gracias a su poder antioxidante se usa en diversas industrias como la farmacéutica, y cosméticas, sin embargo la corteza de este fruto es rica en muchos componentes químicos se encuentra dentro de la cáscara la cual es un residuo del fruto, pudiendo este ser aprovechado para la extracción de aceites esenciales. (Rivada 2008)

Los cítricos pertenecen a la familia Rutáceas y se encuentran agrupados en la subfamilia *Aurantioideae*. Los géneros más importantes son: *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella*. Las especies del género *Citrus* son las más importantes desde el punto de vista agronómico y representan casi la totalidad de los cítricos cultivados. El género *Citrus* ha sido clasificado por los taxónomos de diferentes maneras (Tanaka 1977).

La importancia de estas frutas cítricas radica en su alto contenido de antioxidantes, sustancias capaces de bloquear el daño de los radicales libres (como la contaminación, el tabaco, entre otros), evitar el envejecimiento prematuro del organismo y prevenir enfermedades crónicas y degenerativas como el cáncer, el renglón de los cítricos es de un gran dinamismo a nivel mundial, no solamente para sus productos frescos sino igual para los procesados industrialmente (Cano *et. al.* 2008).

Los países del hemisferio Norte son los mayores productores de cítricos, con el 58% de la producción mundial, siendo el restante proveniente de los países del hemisferio Sur, donde el grueso de la producción se concentra en 5 países, la producción de cítricos en 2010 fue liderada por China, Brasil y Estados Unidos. Brasil y Estados Unidos siguen siendo las dos más grandes regiones procesadoras de naranja en el mundo. China es el mayor productor a nivel mundial de mandarinas y clementinas, seguido a larga distancia por España.

India, México y Argentina son los mayores productores de limón y lima (FAO 2008).

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 Origen del Limón

Según Sánchez (2005) el origen histórico del cítrico se encuentra hace unos veinte millones de años, en la era terciaria, pero aquellas variedades, poco se parecen a las actuales naranjas dulces. Los cítricos se cultivan desde hace más de 4 000 años. Los griegos lo usaban para aromatizar el lino y protegerlo de las polillas, mientras que las primeras descripciones de su uso para propósitos terapéuticos se pueden ver en los trabajos de Teofrasto quien es considerado el fundador de la Fitoterapia.

Se sabe también que los helénicos hacían crecer árboles de limón cerca de los Olivos para protegerlos de los ataques de parásitos. Por otro lado, el emperador Romano Nerón era un gran consumidor de este fruto ya que estaba obsesionado con el riesgo de un posible envenenamiento (Sánchez 2005).

1.2.2 Descripción Botánica

Es un árbol pequeño que crece hasta una altura de 6 - 7 metros, se prefieren mantener árboles pequeños mediante podas de formación. La copa es redonda, densa y simétrica. El árbol de lima Tahití tiene la particularidad de nunca entrar en periodo de dormancia o descanso. El rango de crecimiento es reducido en periodos de clima frío, aunque algunos árboles crecen durante todo el año. (Orozco *et. al.* 2008).

1.2.3 Composición y Propiedades

En el fruto del limón al igual que en el resto de los cítricos, se pueden distinguir: la piel o corteza y los gajos. La corteza, a su vez, está formada por los siguientes tejidos: epicarpo y mesocarpo. El epicarpo es la parte más externa de la corteza

del fruto y en él cabe distinguir dos zonas: la epidermis y la hipodermis. En el mesocarpo hay dos zonas perfectamente diferenciadas: el mesocarpo externo y el interno. El epicarpo y el mesocarpo externo b forman la parte coloreada de la corteza, la cual recibe el nombre de flavedo por alusión a su color en el fruto maduro.

El mesocarpo interno está compuesto por células que se han modificado profundamente, agrupándose para formar una especie de red muy compleja, con grandes espacios vacíos, a lo que debe esta parte de la corteza su estructura esponjosa. Como este tejido carece de cromatóforos o son muy escasos su color es blanco o blanquecino, y de aquí el nombre de albedo, que usualmente se da a esta parte de la corteza. En el interior se encuentra la parte comestible, formada por los gajos (endocarpo), envueltos por membranas carpelares (Forte 1990).

El limón contiene un gran número de componentes químicos naturales como son ácido cítrico, ácido ascórbico, minerales y flavonoides, aunque las propiedades saludables, siempre han recaído en su contenido en vitamina C, aportaciones recientes han puesto de manifiesto que éstas también se deben a los flavonoides. En este sentido son numerosos los trabajos de investigación en los que se establece que los flavonoides realizan una gran variedad de acciones biológicas entre las que se incluyen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, antivirales, antimutagénicas y anticarcinogénicas (Davies y Albrigo 1999).

Hay que tener en cuenta que los cítricos no se consumen como fruta fresca sino solo su zumo y que son frutas de menor valor calórico donde su componente mayoritario es el agua, los cítricos destacan su contenido en vitamina C, ácido cítrico y sustancias de absorción astringente, el mineral más abundante es el potasio, la vitamina C interviene en la formación de colágeno, huesos y dientes, glóbulos rojos y favorece la absorción del hierro de los alimentos y la resistencia a las infecciones, el ácido cítrico posee una acción desinfectante y potencia la acción de la vitamina C, el potasio por su parte es necesario para la transmisión

y generación del impulso nervioso, para la actividad muscular normal e interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula (Berk 1980).

1.3 Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos aromáticos que se obtienen por diferentes métodos de extracción, a partir de material vegetal (flores, tallos, raíces, hojas, frutos, y semillas), algunos de ellos indican actividad antibacteriana y antifúngica, evaluadas como una fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos y una alternativas para la preservación de alimentos (Perdones 2016).

Los aceites esenciales lo constituyen una diversa familia de compuestos orgánicos de bajo peso moleculares con grandes diferencia en la actividad microbiana. Los compuestos activos pueden dividirse en cuatro grupos según su estructura química: terpenos, terpenoides, fenilpropenos y otros (Hyldgaard *et. al.* 2012).

Teniendo en cuenta los grupos de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales lo más probable es que su actividad antibacteriana no sea atribuible a un mecanismo específico sino que existan varios blancos en la célula (Carson *et. al.* 2002).

Numerosas investigaciones indican el efecto antimicrobiano que tienen los aceites esenciales extraídos de plantas y especial. Así, el control microbiano mediante el uso de aceites esenciales se ha convertido en una de las áreas de investigación más importantes con la finalidad de sustituir conservadores sintéticos por naturales (Dao *et. al.* 2008).

Una de las limitaciones en el uso de aceites esenciales como antimicrobianos en alimentos es que al utilizarlos de manera directa (fase líquida), son menos eficaces en alimentos que de forma *in vitro*, por lo que se tienen que utilizar concentraciones mayores para obtener el mismo efecto, con el inconveniente de que se modifican los atributos sensoriales del alimento y se altera la calidad del

mismo, por ello es necesario experimentar otras alternativas de aplicación de aplicación, como el uso de aceites esenciales en fase de vapor (Phillips *et. al.* 2011).

Estudios recientes han demostrado que los vapores generados por aceites esenciales poseen efectos antimicrobianos (López *et. al.* 2005) por lo que algunos investigadores (Aslan. *et. al.* 2004; Tzortzakis, 2007; Avilsa-Sosa, *et. al.* 2012) proponen utilizarlos como una alternativa de su aplicación como agentes antimicrobianos, ya que afectarían en menor grado las características sensoriales, asegurando así mismo la inocuidad del producto.

Estudios recientes señalan que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en fase de vapor es eficiente en concentraciones altas y en tiempos cortos (Dao *et. al.* 2008). Aslan, *et al* (2004) evaluaron la actividad de tres aceites esenciales (tornillo, albaca, y ajedrea) contra *Bemisia tabaco* (mosca blanca) y *Tetranychus urticae* (acaro) ambos infestadores de plantas; los resultados mostraron que los tres aceites esenciales fueron tóxicos contra estos organismos. Demostrando que al aumentar dosis del aceite esencial aumentaba el efecto antimicrobiano.

Phillips, *et al* (2011) comprobaron el poder antifugico de una mezcla de aceites esenciales en fase vapor de dos cítricos (bergamota y naranja), al exponerlos en tomates y granos; este estudio demostró que la mezcla de aceites esenciales en fase vapor, funciona como antifugico y no afecto las propiedades organolépticas de los alimentos.

Los efectos antimicrobianos de vapores generados por aceites esenciales contra diferentes microorganismos siguen en estudio, son escasos los reportes que indiquen su posible aplicación en alimentos. Sin embargo, dentro de varias investigaciones se ha mostrado un efecto positivo al utilizar los aceites esenciales en fase de vapor principalmente en empaque activos (Nielsen y Rios 2000; Skandamis y Nychas 2002; Serrano, *et al* 2005). Asimismo Avilsa-Sosa, *et al* (2012) sugieren que los vapores de aceites esenciales, se incorporen en películas comestibles de quitosano.

Los aceites esenciales se utilizan para dar sabor y aroma al café, el té, los vinos y las bebidas alcohólicas. Son los ingredientes básicos en la industria de los perfumes y se utilizan en jabones, desinfectantes y productos similares. También tienen importancia en el campo de la medicina, tanto por su sabor como por su efecto calmante del dolor y su valor fisiológico.

1.3.1 Aceite De Esencial De Cítricos Como Bactericida

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se encuentra relacionada con la composición química, por ejemplo, frutos cítricos cuentan con un promedio de 40 compuestos, los cuales se ven influenciados por métodos específicos de cultivo, extracción y separación; los aceites esenciales de cítricos se encuentran principalmente en la cáscara de la fruta, su extracción es económicamente sostenible, ya que la cáscara constituye una pérdida para la industria de jugos de frutas; en consecuencia, el interés de estos como agentes antimicrobianos y conservantes en los alimentos abre una posible alternativa para sustituir los conservantes y antibióticos convencionales (AL-Jabri 2016).

1.3.2 Solventes usados para concentraciones de Aceites esenciales

Uno de los solventes más utilizados para la concentración de aceites son los polisorbatos también conocidos como tween, son ésteres del polioxietileno sorbitano parcialmente esterificados con ácidos grasos superiores.

El Tween 80 es quizás el más usado en formulación magistral tiene acción protectora y emoliente que ayuda a la conservación de los aceites esenciales también un agente humectante en la formulación de suspensiones orales y parenterales, y un detergente y acondicionador en champús. Aumenta la capacidad de retener agua de los ungüentos (COF 2004).

1.4 PLANTAMIENTO DE PROBLEMA

Los productos alimenticios están frecuentemente propensos a la contaminación causada por agentes patógenos, algunos de ellos generados durante el almacenamiento, el transporte o el procesamiento después de la cosecha, lo que trae consigo pérdidas significativas en la calidad, cantidad y composición de nutrientes, con la consecuente reducción del valor en el mercado. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, los casos registrados de pérdidas de alimentos en mal estado en los que se incluyen cereales, granos, nueces, frutas, verduras, carnes y especias, se reportan en cifras equivalentes a toneladas métricas de alimentos cada año (FAO 2015).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se encuentra relacionada con la composición química, los cítricos cuentan con un gran número de compuesto que son capaces de inhibir crecimiento patógeno estos compuestos se encuentran principalmente en la cascara de estos frutos lo que sería una pérdida para la industria de jugos y que pueden ser utilizados como agentes antimicrobianos de origen natural (Argote y Suarez 2017).

Los aceites esenciales son productos generalmente muy complejos que contienen sustancias volátiles de origen vegetal, más o menos modificadas por los procesos de extracción y conservación. Los aceites esenciales los producen especialmente las plantas aromáticas, ya que aunque la mayor parte de las plantas los contienen, son estas las que concentran una mayor cantidad. Estos aceites esenciales se pueden localizar en diversos lugares dentro de las especies vegetales (Flórez y Méndez 2003).

1.5 JUSTIFICACIÓN

Los aceites esenciales se obtienen tanto de plantas cultivadas como de plantas silvestres, estos se localizan en las denominadas bolsas secretoras, que son sacos que almacenan aceite y en su parte superior contienen las células o las glándulas secretoras que los producen y van llenando la bolsa. El ejemplo más claro es el de la corteza de naranja, limón, mandarina y de otras plantas de la

familia de las rutáceas, que si se frota fuertemente la corteza saldrá el aceite esencial como consecuencia de la rotura de las bolsas secretoras (Lucheroni 2000).

La industria de alimentos generalmente produce grandes cantidades de residuos orgánicos que muchas veces no tienen ningún destino útil por lo cual son desechados, uno de ellos es la cascara del limón la cual puede ser aprovechada para la extracción de aceite esencial, que dentro de la industria cosmética ha tenido un papel muy importante, mientras que en una escala menor ha sido utilizado como antibacterial, por lo tanto realizamos esta investigación para comprobar el poder inhibitorio del aceite esencial de la corteza del limón frente a bacterias como *E. Coli* y *Salmonella* que son los microorganismos que más afectan a los productos alimenticios con valor agregado.

1.6 HIPOTESIS

Los aceites esenciales de cortezas de limones (*citrus spp*) pueden inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos como *E coli* y *salmonella*.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar el poder inhibitorio de los aceites esenciales de cortezas de limones (*Citrus spp*) frente a la *Salmonella* y *E coli*.

1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el rendimiento de dos métodos de extracción de aceite esencial en dos variedades de cortezas de limón.
- Comparar el poder inhibitorio de las dos variedades de aceite de limón mediante un bioensayo.

CAPITULO II

2.1.-METODOLOGÍA

2.2 UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de análisis de alimentos, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, ubicado en la ciudad de Manta, Av. Circunvalación - Vía a San Mateo (Latitud 0°57' S y de Longitud 80°42 W y Altitud aproximada de 20 m.s.n.m) en el periodo 2019-2020.

2.2.1.- Factor De Estudio

Para la presente investigación se utilizaron dos diseños experimentales completamente al azar, uno Trifactorial y el otro Bifactorial, los cuales se detallan a continuación.

- **Diseño Experimental N. °1**

Variables independientes.

- **Factor (A): métodos de extracción.**
 - A1 – Arrastre de vapor
 - A2 – Por Soxhlet
- **Factor (B): corte de la cascara**
 - B1 – Rallado
 - B2 – Cortes de 1cm
- **Factor (C): variedades de limón**
 - C1 – Sutil (*Citrus aurantifolia Swingle*)
 - C2 – Rugoso (*Citrus Jambhiri*)

Variable dependiente

- Rendimiento
- Determinación de densidad

- Determinación del índice de refracción
- Solubilidad en etanol
- **Diseño experimental N. °2**

Variables independientes.

- **Factor (A): concentración de aceites.**
 - A1 – 60% aceite sutil
 - A2 – 60% aceite rugoso
 - A3 – 90% aceite sutil
 - A4 – 90% aceite rugoso
- **Factor (B): Bacterias**
 - B1 – *E.coli*
 - B2 – *Salmonella*

Variable dependiente

- Poder inhibitorio

2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

2.3.1.- Tipo de Diseño

En esta investigación se aplicaron dos diseños completamente al azar, uno trifactorial y el otro bifactorial, con tres replicas por cada tratamiento, en el primer diseño se realizaron dos tipos de extracción con dos variedades de cascara de limón con dos tipos de cortes, escogiendo el mejor tratamiento de cada variedad de las cascaras de limón usadas, en el segundo diseño se procedió a usar los aceites para determinar el poder inhibitorio frente a *Salmonella* y *E.coli*.

2.3.2.- Análisis Estadístico

Se realizó dos análisis de varianza ANOVA y la prueba mínima de comparación de acuerdo a Tukey al 5%. Todos los datos fueron analizados por triplicado y los

resultados fueron procesados por el programa Infostat 2016 como se observa en las tablas 1 y 2.

Tabla N° 1 Análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental N°1

Fuente de variación		G.L
Total	$(t \cdot r - 1)$	23
Tratamientos	$(t - 1)$	7
Repetición	$r - 1$	2
Factor A	FA-1	1
Factor B	FB-1	1
Factor C	FC-1	1
Interacción (AxBxC)	(FAxFBxFC)	1
Error experimental	$(t - 1) (r - 1)$	14

Elaborado por: Guale, A; Mieles, D.2019

Tabla N° 2: Análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental N°2

Fuente de variación		G.L
Total	$(t \cdot r - 1)$	23
Tratamientos	$(t - 1)$	7
Repetición	$r - 1$	2
Factor A	FA-1	3
Factor B	FB-1	1
Interacción (AxB)	(FAxFB)	3
Error experimental	$(t - 1) (r - 1)$	14

Elaborado por : Guale, A; Mieles D. 2019

2.4.- TRATAMIENTOS

En la **tabla N°3**. Se presenta los tratamientos del primer diseño experimental, combinando los factores de estudio tales como; A: métodos de extracción, B: cortes de cascara y C: variedades de limón.

Tabla N° 3. Tratamientos de estudio del diseño experimental 1

#	Tratamientos	Método de extracción	Corte de cascara	Variedades de limón
1	A1B1C1	Arrastre de vapor	Rallado	Sutil
2	A1B1C2	Arrastre de vapor	Rallado	Rugoso
3	A1B2C1	Arrastre de vapor	Cortes x1cm	Sutil
4	A1B2C2	Arrastre de vapor	Cortes x1cm	Rugoso
5	A2B1C1	Soxhlet	Rallado	Sutil
6	A2B1C2	Soxhlet	Rallado	Rugoso
7	A2B2C1	Soxhlet	Cortes x1cm	Sutil
8	A2B2C2	Soxhlet	Cortes x1cm	Rugoso

Elaborado por: Guale, A; Mieles, D. 2019

En la **tabla N°4**. Se muestran los tratamientos del segundo diseño experimental, combinando los factores de estudio tales como: A: concentración de aceites esenciales sutil y rugoso, B: bacteria.

Tabla N° 4. Tratamientos de estudio del diseño experimental 2

#	Tratamientos	Concentración de aceite	Bacteria
1	A1B1	60%aceite sutil	<i>E.coli</i>
2	A1B2	60%aceite sutil	<i>Salmonella</i>
3	A2B1	60% aceite rugoso	<i>E.coli</i>
4	A2B2	60% aceite rugoso	<i>Salmonella</i>
5	A3B1	90%aceite sutil	<i>E.coli</i>
6	A3B2	90%aceite sutil	<i>Salmonella</i>
7	A4B1	90%aceite rugoso	<i>E.coli</i>
8	A4B2	90%aceite rugoso	<i>Salmonella</i>

Elaborado por: Guale, A; Mieles, D. 2019

2.5 MANEJO DEL EXPERIMENTO

La obtención del aceite esencial por el método de destilación se realizó con un equipo destilador en donde dentro del balón se colocaron 50g de materia vegetal y 250ml de agua destilada y se dio inicio la destilación durante un periodo de 3 horas, el proceso se realizó por triplicado para cada variedad de limón y para cada corte, el aceite esencial obtenido se almaceno en recipientes ámbar luego se determinó el rendimiento de cada variedad y de cada tipo de corte, donde se escogieron los dos mejores tratamientos. Una vez escogidos los dos mejores tratamientos estos fueron sometidos a los demás análisis propuestos en la investigación.

Para la extracción de aceite esencial por el método de soxhlet se utilizó el equipo "DET-GRAS N." el cual nos fue facilitado por los laboratorios de la facultad de ciencias agropecuarias, este equipo nos permite trabajar con 6 muestras a la vez, para cada muestra se utilizó 4 a 5g de materia vegetal seca y 45 ml de hexano que fue el disolvente empleado para la extracción, los resultados no fueron los esperados ya que no se obtuvo aceite esencial, lo que se pudo obtener fue un contenido de grasas sólida, que no tenía las características propias de los aceites esenciales. Por lo que se descartó el método soxhlet.

2.6.- METODOS DE ANALISIS

2.6.1.- Extracción de aceite en destilación por arrastre de vapor

Se realizó de acuerdo al método propuesto por Ivonne et al (2011). Se usa para ello un balón de destilación calentado por un lecho de vapor, un dispositivo de refrigeración a reflujo mediante el paso de agua, que termina en un colector para recoger las fracciones terpénicas destiladas. 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 (177°C). El vapor y el aceite esencial son condensados y separados. Los aceites esenciales producidos de esta forma son, frecuentemente, diferentes al aceite original encontrado en el material botánico en varios aspectos.

2.6.2.- Extracción Continua En Soxhlet

Es una técnica muy utilizada y es una combinación de extracción y destilación que permite la recuperación del disolvente. Se emplea en el aislamiento de los aceites esenciales, de sus fuentes naturales por medio de la extracción con disolventes orgánicos, es un proceso muy eficaz en la extracción sólido - líquido, donde la sustancia a extraer se encuentra en estado sólido y el extractor es un líquido. Una de las desventajas de este sistema es que requiere grandes volúmenes de disolvente y es un proceso lento. Sin embargo este método permite la separación de las sustancias con la pureza deseada. En el matraz se coloca el disolvente, se llena el dedal con la materia vegetal, cortada en trozos pequeños, y se coloca en la cámara de extracción. El disolvente debe alcanzar el punto de ebullición y los vapores generados deberán condensarse en el refrigerante para caer sobre la materia vegetal. En el momento en que la cámara de extracción se llena con el disolvente, éste cae, por diferencia de gravedad, al matraz. Este proceso se repite continuamente, de manera que cada vez se extrae mayor cantidad de aceite. (Di Giacomo 1992).

2.6.3.- Porcentaje De Rendimiento De Aceite Esencial.

El rendimiento de los aceites esta expresado en porcentaje de gramos de aceite obtenido por cada cantidad gramos de muestra vegetal invertida (Castaño 2012). Los resultados de rendimiento fueron calculados con la siguiente formula:

$$\%rendimiento = \frac{WAE}{WMV} X 100$$

Donde:

WAE= al peso del aceite esencial obtenido en g

WMV= al peso de la materia vegetal usada.

2.6.4.-Determinación de la Densidad

La densidad relativa se determina con el propósito de encontrar la relación entre el peso y el volumen de la muestra, permite en algunas ocasiones concluir acerca de la composición de los aceites esenciales, como por ejemplo los aceites esenciales con densidades mayores a 1.0g/cm³ contienen principalmente fenoles o sus derivados y esterés; los que presentan una densidad menor son ricos en hidrocarburos menoterpenicos y sesquiterpenicos (Torrenegra y Alarcon 2014). La norma ISO 279: 1998 es la que determina los parámetros para su medición.

Como primer paso se pesó el pignometro vacío y seco, luego se lo peso con la muestra a analizar, y finalmente se lo peso con agua destilada. Para determinar la densidad se realizaron tres mediciones de este parámetro utilizando la siguiente formula: $D = \frac{M1-M}{M2-M}$

M1= peso del pignometro con muestra. (g)

M2= peso del pignometro con agua destilada. (g)

M= peso del pignometro vacío. (g)

2.6.5.- Determinación Del Índice De Refracción

El índice de refracción de una sustancia dada es la relación entre la velocidad de un rayo de luz en el vacío y la velocidad de la luz a través de la sustancia. Por conveniencia práctica se refiere a la relación aire sustancia. Es igualmente la relación del seno del ángulo de incidencia al seno del ángulo de refracción (ISO 280 1976). El equipo utilizado fue un refractómetro digital, se comenzó con la calibración del equipo con agua destilada, luego se colocó una gota del aceite esencial y se procedió a la medición.

2.6.6.- Solubilidad En Etanol

Generalmente los aceites esenciales son sólo ligeramente solubles en agua y miscibles en etanol absoluto. La determinación del número de volúmenes de alcohol diluido, a una graduación dada, que se requieren para la completa solubilización de un volumen de esencia, es una ayuda rápida en la evaluación

de su calidad; aceites esenciales ricos en constituyentes oxigenados son más solubles en etanol diluido que los aceites en cuya composición predominan los hidrocarburos terpénicos. La temperatura influye en la solubilidad: según las normas que se apliquen (USP, NF, BP) se determina de 15 a 25°C. Se determina la solubilidad según ISO 875 (1981) a 20°C.

Para este proceso se agregó 0.5 ml de aceite esencial en dos tubos de ensayos donde en uno se colocó 10ml de etanol y en el otro 10ml de agua destilada, para proceder con la observación de la solubilidad.

2.6.7.-Determinación Del Índice De Acidez

Este procedimiento determina la cantidad de miligramos de hidróxido de potasio (KOH) que se necesitan para neutralizar a los ácidos grasos liberados contenidos en 1g de aceite esencial (Aguirre y Gutiérrez 2016).

En un vaso de precipitación se pesó 2g del aceite esencial, se adiciono con una pipeta 5ml de alcohol etílico, 5 gotas de fenolftaleína, mediante un equipo de titulación, se procedió a neutralizar la disolución con hidróxido de potasio 0.1 N, hasta observar un cambio de coloración persistente.

2.6.8.- Elaboración de las Concentraciones del Aceite Esencial

Se realizó de acuerdo al método propuesto por (López 2018) en el cual se utiliza tween 80 como solvente, las concentraciones se calcularan mediante el método de dilución, que serán calculadas en un volumen de 3ml.

2.6.9.- Actividad Antimicrobiana (Método De Difusión De Discos En Agar

Como análisis de control antimicrobiano se empleó el método de difusión de discos en agar según la técnica estandarizada por el National Committee For Clinical Laboratory Estandards (NCCLS, 2009). Se depositaron aproximadamente 20 µL del agente en estudio en disco del papel filtro (Fisher Scientific Q2) de 5 mm de diámetro posteriormente estos discos fueron colocados en placas que contenían el medio inoculado con *Salmonella Spp* y *E. coli*. Las placas se incubaron a una temperatura de 37 °C por 24 horas. Al final de ello, se midieron los halos de inhibición del crecimiento de patógenos. En todos los casos la evaluación se realizó por triplicado.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Porcentaje De Rendimiento De Aceite Esencial.**

La tabla 5 refleja el porcentaje de rendimiento de aceite obtenido por medio de la destilación por arrastre de vapor de las cascaras de limón de las dos variedades, por los dos tipos de cortes empleados donde se escogieron los dos mejores tratamientos basándonos en el rendimiento, los tratamiento que se determinaron como mejores fueron los cortes x 1cm sutil con un rendimiento de 0.97% con una diferencia de 0.29% en comparación con el rallado sutil y los cortes x 1cm rugoso con un rendimiento de 1.08%, con una diferencia de 0.32% en comparación con el rallado rugoso. Estos aceites obtenidos de estos tratamientos fueron los que se aplicaron a lo largo de los demás análisis del presente trabajo.

Tabla 5.- Porcentaje de rendimiento por extracción por destilación de arrastre de vapor

Tipos de corte	% de rendimiento
Rallado sutil	0.68 A
Rallado rugoso	0.76 A B
Cortes x 1cm sutil	0.97 B C
Cortes x 1cm rugoso	1.08 C
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,5$)	

Elaborado por: Guale, A; Mielles, D. 2019

Los resultados obtenidos concuerdan con la literatura ya que los rendimientos de extracción para aceites varían del 0.5 al 2% según (Pérez, 2006), por lo tanto, los rendimientos obtenidos se encuentran dentro del rango. Santacruz (2006) reporta que utilizando la misma metodología el rendimiento para el aceite del té de limón, laurel y cilantro es menor a 0.86% porcentaje que está relacionado con los que fueron escogidos como mejores tratamientos de la extracción por destilación de arrastre de vapor.

- **Determinación De La Densidad**

La tabla 6 muestra la densidad del aceite esencial de limón sutil y rugoso por cortes de 1cm donde se sacó un promedio de las 3 muestras por cada variedad donde la diferencia entre ambas es de 0.03 siendo la densidad del aceite de cascara de limón sutil más alta con 0.85 y la de limón rugoso la menor con 0.82.

Tabla 6.- Densidad De Aceites Esenciales De Las Dos Variedades De Cascara De Limón

Muestra	Densidad AE limón sutil	Densidad AE limón rugoso
1	0.87	0.80
2	0.89	0.84
3	0.81	0.82
Promedio	0.85	0.82

Elaborado por: Guale, A; Mieles, D. 2019

Teniendo en cuenta que los datos encontrados por Liberti *et. al.* en 1998 y posteriormente por Drouet en 2001 y Di Giacomo y Mincione en 2003, varían sus mínimos entre 0,8462; 0,849; 0,8555 y 0,8566 y sus máximos respectivos entre 0,8575; 0,858; 0,8572 y 0,8590, se consideran los valores correspondientes al aceite esencial de la cascara de limón sutil dentro del rango de la literatura mientras que el aceite obtenido de la cascara del limón rugoso está ligeramente por debajo de los valores normales para el aceite esencial de limón.

- **Determinación Del Índice De Refracción**

La tabla 7 muestra el índice de refracción del aceite esencial de limón sutil y rugoso por cortes de 1cm donde se sacó un promedio de las 3 muestras por cada variedad donde la diferencia entre ambas es de 0.0058 siendo el índice de refracción del aceite de cascara de limón sutil más alto con 1.4731 y la de limón rugoso la menor con 1.4673.

Tabla 7.- Medidas de índice de refracción de las muestras de aceite esencial.

Muestra	Índice de refracción limón sutil	Índice de refracción limón rugoso
1	1.4739	1.4600
2	1.4690	1.4720
3	1.4765	1.4700
Promedio	1.4731	1.4673

Elaborado por: Guale, A; Mieles, D. 2019

El aceite esencial de limón debe presentar según la norma ISO 855 (1981) un valor comprendido entre 1,4740 y 1,4760. El FCC (Food Chemical Codex, 1981), determina para la esencia destilada de limón valores comprendidos entre 1,4740 y 1,475. Di Giacomo *et. al.* (1994) encuentran valores comprendidos entre 1,4734 y 1,4765 para aceite esencial de limón producido en Italia, y para destilados entre 1,4724 y 1,4750, los deterpenados quedan comprendidos en torno a 1,4810. Liberti *et. al.* (2006) para aceite esencial de limón producido en la Región de Murcia obtienen índices de refracción comprendidos entre 1,4727 y 1,4754 en muestras extraídas en frío. Las muestras que se utilizaron reflejaron un índice de refracción ligeramente inferior a los que la literatura expresa como valores estándares.

- **Solubilidad En Etanol.**

Las muestras de aceites esenciales de las dos variedades sometidas a la prueba indican que son solubles. Datos que coinciden con el estudio realizado por Godínez *et. al.* (2001). Sobre la obtención y caracterización del aceite esencial del tomillo.

Así mismo coinciden con lo expuesto por Tellez y Nolzco (2017) en su estudio de la composición química del aceite esencial del orégano donde indica que los aceites esenciales son solubles en etanol.

- **Determinación del índice de acidez**

La tabla 8 muestra el índice de acidez del aceite esencial de limón sutil y rugoso por cortes de 1cm donde se sacó un promedio de las 3 muestras por cada variedad donde la diferencia entre ambas es de 0.1051mgKOH/g siendo el índice de acidez del aceite de cascara de limón sutil más baja con 0.1751 mgKOH/g y la de limón rugoso la más alta con 0.2802 mgKOH/g.

Tabla 8.- índice de acides de aceites esenciales

	AE limón sutil	AE limón rugoso
Índice promedio de acides.	0.1751 mgKOH/g	0.2802mgKOH/g

Elaborado por: Guale, A; Mieles, D. 2019

Los resultados obtenidos del índice de acides de los aceites esenciales de limón de cascara rugosa están relacionados con la investigación de Hernández *et. al.* (2016) que refleja unos valores de 0.2952 mgKOH/g de índice de acides para aceite esencial de orégano. Mientras que el índice de acidez para los aceites de cascara de limón sutil están por debajo del valor de la literatura.

- **Efecto Inhibitorio en *E. Coli.***

Los resultados obtenidos de la inhibición de los aceites esenciales de la cascara de limón sutil y rugoso, reflejan que estadísticamente la media de las concentraciones de aceite a 90% tanto para el sutil y el rugoso no resultados significativamente diferentes siendo las de menor diámetro de halo de inhibición. Las concentraciones de aceite a 60% tanto de sutil como rugoso tampoco resultaron ser significativamente diferente sin embargo la concentración de sutil a 60% refleja un mayor efecto inhibitorio frente a la bacteria *E.coli.*

Tabla 9.- Halos de inhibición de las concentraciones de aceites esenciales de cascara de limón sutil y rugoso frente a la bacteria *Echerichia coli*.

Concentraciones	Diámetro de halo inhibición(mm)
90% AE rugoso	6.67 A
90% AE sutil	7.22 A
60% AE rugoso	12.44 B
60% AE sutil	15.00 B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)	

Elaborado por: Guale, A; Mieles, D. 2019

Los resultados reflejados en la tabla 9 fueron contrarios a los que se esperaba, ya que la concentración a 60% tanto de la variedad de sutil como rugoso fueron los que mayor halo de inhibición presentaron en comparación con las concentraciones a 90% que fueron las de menos inhibición, sin embargo estos valores están relacionados con la investigación de López (2018) que determino la sensibilidad bacteriana del aceite de orégano a concentraciones de 30%, 60% y 90% donde sus resultados para la concentración de 60% presentaron un halo de inhibición de 17.62mm. Por otra parte en la investigación de Tong *et. al.* (2005) se reportaron halos de inhibición para *E.coli* de 16mm, confirmando que los aceites esenciales son capaces de inhibir el crecimiento de esta bacteria.

- **Efecto Inhibitorio En *Salmonella Spp***

Los resultados que se observan en la tabla 10 nos indica que las concentraciones de 60% de aceite de cascara de limón rugoso y las de 90% y 60% de aceite de cascara de limón sutil no presentan una diferencia significativa a comparación de la concentración a 90% de aceite de cascara de limón rugoso que presento un halo de inhibición inferior de 7.67mm, determinando como mejor tratamiento la concentración de aceite de cascara de limón sutil al 60% con un diámetro de halo inhibición de 14.33mm.

Tabla 10.- Halos de inhibición de las concentraciones de aceites esenciales de cascara de limón sutil y rugoso frente a la bacteria *Salmonella spp.*

Concentraciones	Diámetro de halo inhibición(mm)
90% AE rugoso	7.67 A
60% AE rugoso	12.67 A B
90% AE sutil	13.22 A B
60% AE sutil	14.33 B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)	

Elaborado por: Guale, A; Mieles, D. 2019

La concentración de aceite que presento un diámetro de halo inhibición superior frente a la bacteria *Salmonella spp* fue la de 60% de cascara de limón sutil con 14.33mm. Algo similar ocurre con el trabajo de Montero *et. al.* (2017) que menciona que Las cepas de *Salmonella* son sensibles a concentraciones de aceite esencial a concentraciones de 50% o superiores. En la investigación denominada; “Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario”. Refiere que, al evaluar el efecto bactericida de extractos acuosos de canela, clavo, laurel y tomillo, sobre cepas de *Salmonella spp*, el extracto de canela mostró un amplio espectro de acción, al detener el crecimiento de todas las bacterias ensayadas (Herrera y Rico, 2006).

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

- Se determinó que de los dos métodos de extracción empleados el de mejor rendimiento fue mediante destilación por arrastre de vapor en donde los cortes de 1cm presentaron mayor porcentaje de rendimiento, 0.97% para cascara de limón sutil y 1.08% para cascara de limón rugoso, a comparación del rallado donde se obtuvo 0.68% para cascara de limón sutil y 0.76% para cascara de limón rugoso, se concluye que esta diferencia se debe a que al momento del rallado parte del aceite se queda en el material utilizado para rallar. Del método soxhlet no se pudo extraer aceite esencial, sino un contenido de grasa sólida que no tenía las características propias de los aceites esenciales.

- Se evidencio que las dos variedades de aceite esencial de limón empleadas para la inhibición de las bacterias, la de menor eficacia fue de la variedad del limón rugoso ya que su poder de inhibición fue inferior en las dos concentraciones empleadas a comparación de la variedad de limón sutil que presento mayor poder inhibitorio.

- Respondiendo a la hipótesis que se planteó en el presente trabajo, los aceites esenciales de limón si son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos como *E.coli* y *Salmonella*.

4.2 Recomendaciones

- Usar otros métodos de extracción de aceites esenciales para realizar comparaciones de rendimiento con la presente investigación.
- Es de gran importancia llevar a cabo estudios con diferentes tipo de bacterias aplicando estos tipos de aceites esenciales con la finalidad de demostrar si estos aceites poseen amplio actividad antimicrobiana.
- Usar otras concentraciones con otro tipo de solvente orgánico para las diluciones.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Jabri, N.N, Hossain, M.A. 2016 Chemical composition and antimicrobial potency of locally grown lemon essential oil against selected bacterial strains. *Journal of King Saud University – Science*, 60(30)
- Argote, F; Suarez, S. 2017. Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales. p. 15-18.
- Aslan, I., Ozbek, H., Calma, sur, O.; Sah In. F. 2004. Toxicity of essential oil to two greenhouse pest, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisa tabaco* Genn. *Industrial Crops and Products*. p. 167-173.
- Avila-Sosa, R., Palou, E., Jimenez, M.T., Nevarez-Moorillon, G.V., Navarro, A. R.; Lopez-Malo, A. 2012. Antifungal activity by vpor contact of essential oils added to amaranth, chotosan, or starch edible films. p 66-72.
- Berk Z. 1980. "Introducción a la bioquímica de alimentos", Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V, México. p. 88.
- Cano, A.; Medina, A.; Bermejo, A. 2008. Bioactive compounds in different citrus varieties. Discrimination among cultivars. En: *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 21, p 377– 381.
- Carson, CF; Mee, BJ. ; Riley TV. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (teatree) oil on *staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother*: p 46.
- COF (Colegio Oficial de Farmacéuticos) 2004. *Formulación magistral de medicamentos*,5ª ed.
- Dao, T., Bensoussan, M., Gervais, P.; Dantigny, P. 2008. Inactivation of conidia of *Penicillium chrysogenum*. *P. digitatum* and *P. italicum* by etanol solutions and vapours, *international Journal of Food Microbiology*. p 68-73.
- Davies, F.S.; Albrigo, L.G. 1999. *Cítricos*. Ed. Acribia, 283 p. Zaragoza
- Di Giacomo,A. ; Mincione,B. 1994. *Gli olii essenziali agrumari in Italia*. Sottoprogetto 4, monografia raisa nº3. Laruffa Editore.

- Di Giacomo,A. ; Mincione,B. 2003. Gli olii essenziali agrumari in Italia. Sottoprogetto 4, monografia raisa n°3. Laruffa Editore.
- Di Giacomo,A. 1992. Gli Oli Essenziali degli agrumi. 2eed., Riv.It. E.P.P.O.S., Milano.
- Drouet,S. 2001. Contribution a l'etude d'une huile essentielle de citron de Côte d'Ivoire et au controle des medicaments aromatises au citron. Thèse pour l'obtention de grade de Docteur. Nantes. p 120-125
- Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación FAO 2015. Pérdidas y desperdicio de alimentos el mundo. Roma (Italia): p 42.
- Flórez Olaya.; Méndez Jacobo 2003. Guía de plantas y productos medicinales. Serie ciencia y tecnología, Bogotá: convenio Andrés Bello, p 123
- Food And Agriculture Organization. FAO 2008. The Statistics Division. Major food and agricultural commodities and producers. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Economic and Social Department. (En línea): www.fao.org/es/ess/top/topproduction.html.
- Food Chemical Codex. 1981. National Academic Press. Washington, D. C. 3rd Ed.
- Forte, V. 1990. Il limone. Edizioni Agricole. Bologna. P 90.
- Godines. E., Can, T., Chavez, B ; Barrientos. 2001. Obtención y caracterización del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) cultivado en Guatemala, utilizado en diversidad de productos farmacéuticos (Trabajo de investigación). Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado de <http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puidi/INF-2002-041.pdf>.
- Hernandez, L., Abraham, M., Martinez, J., Perez, L.; Mares, E. 2016. Aceite esencial de oregano como potencias nutraceutico. Investigación y desarrollo en Ciencia y Tecnologia de Aliemtos. p 453-458.
- Herrera, F.; -Rico, R. 2006. Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas

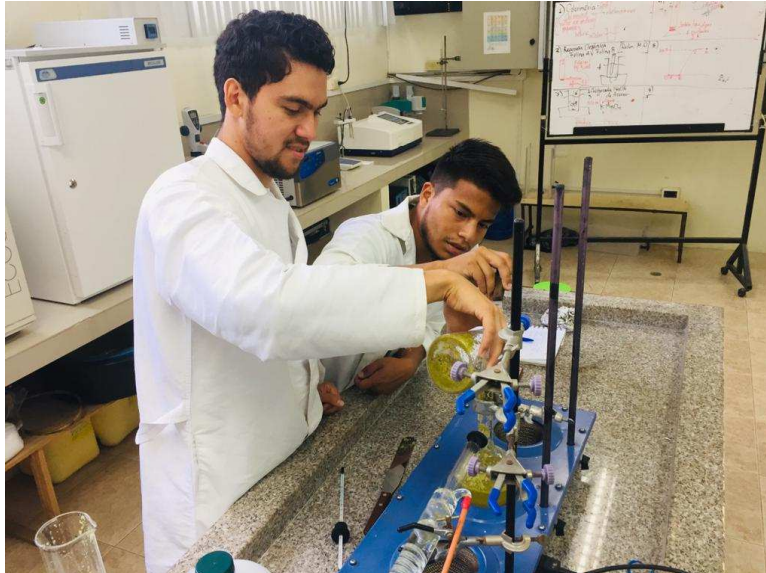
- bacterianas patógenas de origen alimentario. Revista de La Facultad de Ciencias Básicas, 4(0120–4211), p.13–19
- Hyltdgaard M.; Mygin T.; Meyer RL. 2012 Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. front microbiol. p 12.
- INEN 1750. 2017 Hortalizas y frutas frescas. Muestreo
- INEN 1757. 2011 Frutas frescas. Limón
- INEN 380. 2008 Conservas vegetales. Determinación de sólidos solubles.
- INEN 381. 2006. Conservas vegetales. Determinación de acidez titulable. Método potenciométrico de referencia
- INEN 382. 2013. Segunda revisión. Conservas vegetales. Determinación de materia. Seca (sólidos totales)
- INEN 391. 1985. Conservas vegetales. Jugos de frutas. Determinación de la densidad relativa
- ISO 855: Essential oils. 1981. Oil of lemon Italy obtained by expression.
- Liberti,A., Carpena,O., Laencina,J. ., Goretti,G. 1998. Estudio de las características del aceite esencial de limón español. I Congreso Mundial de Citricultura. Murcia -Valencia.pp. 100-102
- Liberti,A., Carpena,O., Laencina,J., Goretti,G. 2006. Estudio de las características del aceite esencial de limón español. I Congreso Mundial de Citricultura. Murcia -Valencia.
- Lopez, P., Sanchez, C., Batle, R.: Nerin, C. 2005. Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils; susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. Journal of Agridultural and Food Chemistry. p 4348-4356.
- Lopez. E. 2018. “Efecto Antimicrobiano In Vitro Del Aceite Esencial De Orégano (*Origanum Vulgare*) Sobre Cepas Certificadas De *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. p 25-29

- Lucheroni, V. 2000. La extracción supercrítica de Especies Naturales. Revista Industria Alimenticia.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS 2009. Broth Macrodilution Technique, Vol. 37(6), p. 1881-1999.
- Nielsen, P.: Rios, R. 2000. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the posible application in active packaging with peacial emphasis on mustard essential oil. Internaational Journal of Food Microbiology. p 219-229.
- Orozco M; Robles G; Vázquez L; Timmer L.W. 2008. Biología y manejo integrado de antracnosis de los cítricos en México Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. p 16
- Perdones, A. 2016. Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage. Food Chemistry, p 979-986.
- Perez, T.2006. Efectividad de los vapores de aceites de tomillo y oregano como agentes antibacteriales. Universidad de las américas , puebla. p 46-48.
- Phillips, C., Laird, K. ; Allen, S.C. 2011.The use of Citri-Vtm- An antimicrobial citrus essential oil vapour for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Alternaria alternate* in vitro and onf food. Food Research International. p 1-5.
- Rivada, J. 2008. Producción de ácido cítrico. Universidad de Cadiz. pp 78-80.
- Sánchez, C. 2005. “Producción y Comercialización de Cítricos”, ediciones Ripalme, Lima. p 25 a 29; 110,111
- Santacruz, Y. 2006. Efectividad de hipoclorito de sodio y aceites esenciales de semilla de cilantro y hojas de laurel. Universidad de las américas de puebla. p 50-52
- Serrano, M., Martinez-Romero,D., Castillo, S., Guillen.F. ; Valero, D. 2005. The use of natural antifungal compounds improves the beneficial effect of

- MAP in sweet cherry storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. p 115-123.
- Skandamis, P.; Nychas, G-J. 2002. Preservation of fresh mear with active and modified atmosphere packaging conditions. *Journal Food Microbiology*. p 35-45.
- Tanaka, T. 1977. Fundamental discussion of Citrus classification. In: *Studia Citrologica*. Vol. 14. p 1-6.
- Tellez, L.,; Nolazco, D. 2017. Estudio de la composicion química del aceite esencial de oregano (*Origanum vulgare spp*) de Tacna. *Ingeniería Industrial*. Pp. 195-205. Recuperado de: www.redalyc.org/pdf/3374/337453922010.pdf.
- Tong, G., Yulong, M., Peng, G.; Zirong, X. 2005. Antibacterial effects of the Cu(II)-exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K88 and *Salmonella choleraesuis*. *Veterinary Microbiology*, 105(2), p 113–122.

ANEXOS

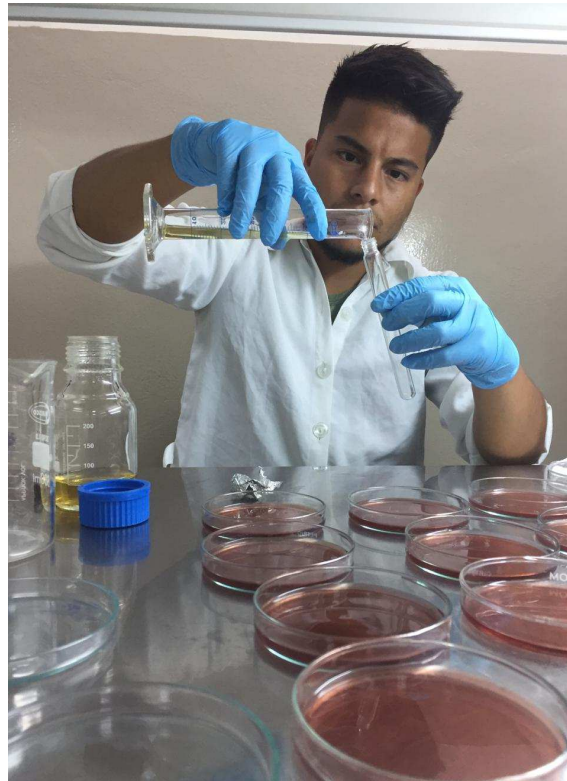
Anexo N°. 1 Extracción de aceite esencial por destilación de arrastre de vapor.



Anexo N°. 2 Muestras de aceite esencial extraído de las cáscaras de limón sutil y limón rugoso



Anexo N°. 3 inoculaciones de bacterias en medio de cultivo.



Anexo N°. 4 Resultado de porcentaje de rendimiento de extracción por destilación de arrastre de vapor.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RENDIMIENTO	12	0,85	0,79	9,65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,31	3	0,10	14,84	0,0012
TIPOS DE CORTE	0,31	3	0,10	14,84	0,0012
Error	0,06	8	0,01		
Total	0,37	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,21990

Error: 0,0071 gl: 8

TIPOS DE CORTE	Medias	n	E.E.
AE SUTIL R	0,68	3	0,05 A
AE RUGOSO R	0,76	3	0,05 A B
AE SUTIL 1cm	0,97	3	0,05 B C
AE RUGOSO 1cm	1,08	3	0,05 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo N°. 5 Resultados de halos de inhibición de las concentraciones de aceites esenciales de cascara de limón sutil y rugoso frente a la bacteria *Echerichia coli*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HALO INHIBICION	36	0,77	0,75	19,49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	444,22	3	148,07	36,51	<0,0001
CONCENTRACIONES	444,22	3	148,07	36,51	<0,0001
Error	129,78	32	4,06		
Total	574,00	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,57209

Error: 4,0556 gl: 32

CONCENTRACIONES	Medias	n	E.E.
90% AE RUGOSO	6,67	9	0,67 A
90% AE SUTIL	7,22	9	0,67 A
60% AE RUGOSO	12,44	9	0,67 B
60% AE SUTIL	15,00	9	0,67 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Anexo N°. 6 Resultados de halos de inhibición de las concentraciones de aceites esenciales de cascara de limón sutil y rugoso frente a la bacteria *Salmonella spp.*

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HALO INHIBICION	36	0,22	0,14	42,89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	235,42	3	78,47	2,98	0,0461
CONCENTRACIONES	235,42	3	78,47	2,98	0,0461
Error	843,56	32	26,36		
Total	1078,97	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,55756

Error: 26,3611 gl: 32

CONCENTRACIONES	Medias	n	E.E.
90% AE RUGOSO	7,67	9	1,71 A
60% AE RUGOSO	12,67	9	1,71 A B
90% AE SUTIL	13,22	9	1,71 A B
60% AE SUTIL	14,33	9	1,71 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)