



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

CARRERA: QUIMICA INDUSTRIAL



**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN
QUIMICA INDUSTRIAL**

TÍTULO: Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. **UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.**

Autoras:

Bra. María Monseratt Abud Espinoza

Bra. Elieth Antonieta Gutiérrez Narváez

Tutora:

MSc. Indira Guevara López

Asesor Técnico:

Lic. Rolando Barillas

Managua, 04 de noviembre 2020.

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso y a la Virgen María.

Por haberme permitido llegar hasta este punto de mi vida, además de su infinita bondad conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente.

A mis padres *Gabriel Abud Vivas* y *Brenda Espinosa Tam*, por su apoyo incondicional, por sus sacrificios durante todo este tiempo, sus palabras de aliento, sus consejos y haberme formado con buenos valores.

A mis hermanos *Gary* y *Gabriel Abud* por apoyarme en todo momento.

A mi amiga *Elieth Gutiérrez*, que gracias al equipo que formamos, logramos llegar hasta el final del camino y hacer de esta experiencia una de las más especiales.

Monseratt Abud Espinoza.

DEDICATORIA

A Dios por dame la oportunidad de culminar con éxito.

A mi madre *Fátima Narváez (q.e.p.d.)* pilar fundamental en mi vida, por darme todo su apoyo durante mis estudios y compartir conmigo muchos momentos tanto alegres como tristes, por tener siempre tendida su mano amiga ya que su anhelo había sido que llegara este momento, aunque ya no estés físicamente siempre te siento a mi lado.

A mi padre *Raymundo Gutiérrez*, por su apoyo para poder llegar a este punto de mi carrera.

A mis hermanas y mis sobrinos por sus palabras y su compañía.

A mi amiga *Monseratt Abud*, que gracias al equipo que formamos logramos llegar hasta el final del camino y hacer de esta experiencia una de las más especiales.

Elieth Gutiérrez Narváez.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo. Agradecemos en primer lugar:

A nuestra tutora,

MSc. Indira Guevara López, por su generosidad al brindarnos la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo. Por alentarnos a participar en el fondo de investigación.

Al FPI,

Al Fondo de proyecto de investigación, que sin ellos no hubiera sido posible esta investigación.

A MSc. Nadiyah S. Cisneros López,

Responsable de Laboratorio Bioanálisis Clínico, Polisal, UNAN-Managua por su apoyo con las cepas de referencia utilizadas en el estudio.

A Lic. Rolando Barillas,

Por habernos brindados su amistad, su valioso conocimiento y asesoramiento.

A Lic. Gaudy Obando,

Por su asesoramiento, paciencia y amistad que nos brindó durante esta valiosa experiencia durante la extracción de los aceites esenciales.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Carta Aval del Tutor



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Carta Aval del Tutor

Managua, martes 02 de marzo 2021.

MSc. Frank Medrano
Director Departamento de Química
Facultad de Ciencias e Ingeniería.
UNAN, Managua
Su despacho.

Estimado Maestro Medrano:

Reciba un cordial saludo de mi parte.

Me dirijo a usted en carácter de Tutor de la tesis de grado titulada: "Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 – 2020" presentada por las estudiantes: Bra. María Monseratt Abud Espinoza (Carnet N° 09040436) y Bra. Elieth Antonieta Gutiérrez Naváez. (Carnet N°11042218). Para optar al título de Licenciatura en Química Industrial. Este proyecto de investigación fue desarrollado en los Laboratorios de Química y Biología de la UNAN-Managua y financiado en conjunto con los Fondos para Proyectos de Investigación (FPI), y por este medio hago constar la incorporación de todas observaciones realizadas por el honorable comité evaluador por lo tanto el documento cumple los requisitos para su entrega final.

Agradeciendo la atención a la presente, me despido.

Atentamente,

MSc. Indira Guevara López.
Docente titular del Departamento de Biología.

¡A la libertad por la Universidad!

Rotonda Universitaria Rigoberto López Pérez, 150 metros al Este. | Recinto Universitario "Rubén Darío"
Cod. Postal 663 – Managua, Nicaragua | Telf.: 2278 6764 / Ext. 5102 | www.unan.edu.ni

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Carta Aval del Asesor



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Carta Aval del Asesor

Managua, Lunes 30 de noviembre 2020

MSc. Frank Medrano
Director Departamento de Química
Facultad de Ciencias e Ingeniería.
UNAN, Managua
Su despacho.

Estimado Maestro Medrano:

Reciba un cordial saludo de mi parte.

Me dirijo a usted en carácter de Asesor técnico de la tesis: "Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 – 2020" presentada por las estudiantes: Bra. María Monseratt Abud Espinoza (Carnet N° 09040436) y Bra. Elieth Antonieta Gutiérrez Narváez. (Carnet N°11042218). Para optar al título de Licenciatura en Química Industrial. Este proyecto de investigación fue desarrollado en los Laboratorios de Química y Biología de la UNAN-Managua, y por este medio hago constar que en el documento han sido incorporadas las observaciones hechas por el excelentísimo comité examinador durante la pre-defensa por lo que el documento cumple los requisitos para ser sometido a su presentación pública y evaluación por parte del comité examinador.

Agradeciendo la atención a la presente, me despido.

Atentamente,

Lic. Rolando Barillas Mendoza
Departamento de Química.
Facultad de Ciencias e Ingenierías

¡A la libertad por la Universidad!

Rotonda Universitaria Rigoberto López Pérez, 150 metros al Este. | Recinto Universitario "Rubén Darío"
Cod. Postal 663 – Managua, Nicaragua | Telf.: 2278 6764 / Ext. 5102 | www.unan.edu.ni

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Acrónimos

ATCC: American Type Culture Collection

ADE: Agua destilada estéril

C.a.L.: *Citrus.aurantium.L.*

C.s.L.: *Citrus.sinensis.L.*

C.r.L.: *Citrus.reticulata.L.*

E. coli: *Escherichia coli*

UFC: Unidades formadoras de colonias.

Resumen

Palabras claves: Aceites esenciales, Rendimiento, acción bactericida, disminución de la carga microbiana.

El presente trabajo se realiza con el objetivo de investigar si el aceite esencial de las semillas de las variedades *Citrus.aurantium.L.*, *Citrus.sinensis.L.* *Citrus.reticulata.L.*, posee acción bactericida ante dos tipos de cepas de referencia *Escherichia coli* (ATCC) 25922 y *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923, por ser representativas para Gram (+) y Gram (-), y probar la acción bactericida de los aceites esenciales a las distintas concentraciones mediante los métodos microbiológicos Kirby-Bauer y método modificado de pozos en agar. Así mismo para constatar la disminución de la carga microbiana en lavado en frutas (guayabas) y verduras (zanahorias), ya que puede consumirse cruda al natural, pero también se emplea para la preparación de ensaladas, sopas, jugos y postres, considerando que algunos problemas pueden generarse desde la cosecha y pueden transferirse a otras fases como el procesamiento, empaque, transporte, comercialización e inclusive en la preparación del producto y su consumo, se realizó mediante el método de Conteo en placas con la finalidad de la elaboración de producto en un futuro.

Empleando la metodología en estudio se comprobó que el aceite esencial *Citrus.reticulata.L.*, posee mayor actividad antimicrobiana frente a ambas cepas *Escherichia coli* (ATCC) 25922 y *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923. Al evaluar la reducción de la carga microbiana en el lavado de las frutas (guayabas) y verduras (zanahorias), presenta mayor actividad bactericida en todas las concentraciones en estudio el aceite esencial de la variedad *Citrus.aurantium.L.* y *Citrus.sinensis.L.*

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	iii
CARTA AVAL DEL TUTOR	iv
CARTA AVAL DEL ASESOR	v
RESUMEN	vii
CAPITULO I: Aspecto Generales	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	4
1.4. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	5
CAPÍTULO II	7
2.1. ANTECEDENTES:.....	7
2.2. MARCO TEÓRICO	8
2.2.1. Especie Vegetal: (<i>Citrus aurantium</i> L., <i>Citrus sinensis</i> L. y <i>Citrus reticulata</i> L.) ...	8
2.2.1.1. Descripción General:	8
2.2.1.2. La naranja consta de: Corteza o exocarpo; Corteza blanca o mesocarpo, Endocarpo o pulpa y Semillas.	8

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

2.2.1.3. <i>Citrus aurantium</i> L	10
2.2.1.4. <i>Citrus sinensis</i> L	11
2.2.1.5 <i>Citrus reticulata</i> L	12
2.2.2. Generalidades de los aceites esenciales.....	13
2.2.3. Método de extracción aceite esencial de semillas de <i>citrus</i> por el método Soxhlet	14
2.2.4. Descripción de las cepas de referencia	16
2.2.5. Método para evaluar la acción bactericida de los aceites esenciales.....	19
2.3. HIPÓTESIS	24
CAPITULO III: Diseño Metodológico	26
3.1. Descripción del ámbito de estudio	26
3.2. Tipo de estudio	26
3.3. Población y muestra	26
3.3.1. Población	26
3.3.2. Muestra	26
3.3.2.1. Criterios de Inclusión.....	27
3.3.2.2. Criterios de Exclusión	27
3.3.3. Variables y Operacionalización.....	24
3.3.4. Materiales y métodos.....	26
3.3.4.2. Materiales para recolectar la información	29
3.3.4.3. Materiales para procesar la información	29

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

CAPÍTULO IV: Análisis de Resultado	33
4.1. Rendimiento de aceites esenciales en semillas de variedades.....	34
4.2. Acción bactericida en cepas referencia <i>Escherichia coli</i> (ATCC) 25922.	35
4.2.1. Acción bactericida en cepas referencia <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC) 25923	37
4.3. Acción bactericida en cepas referencia <i>Escherichia coli</i> (ATCC) 25922 por método modificados de Pozos en agar	39
4.3.1. Acción bactericida en cepas de referencia <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC) 25923 por el método de Pozos.....	41
4.4. Disminución de carga microbiana en lavado verduras con aceites esenciales.	43
4.4.1. Disminución de carga microbiana en lavado de frutas (guayabas) con aceites esenciales	44
CAPÍTULO V	46
5.1. Conclusiones.....	47
5.2. Recomendaciones	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	51
ANEXOS	52
GLOSARIO	65

Índice de Figura:

<i>Figura 1: Partes de las variedades Citrus</i>	10
<i>Figura 2: Inoculación del medio</i>	20
<i>Figura 3: Formación de los halos de inhibición</i>	20
<i>Figura 4: Inoculación del medio.</i>	21
<i>Figura 5: Adición de los aceites esenciales</i>	21

Índice de Gráficos:

Gráfico N°1: Comparación Porcentaje de Rendimiento de aceites esenciales	34
Gráfico N°2: Comparación de acción inhibitoria en cepa <i>Escherichia Coli</i> (ATCC) 25922 utilizando aceites esenciales a diluciones 100 %, 75 %, 50 % y 25 %.....	35
Gráfico N°3: Comparación de la acción inhibitoria en la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC) 25923 con los aceites esenciales a concentración de 100, 75, 50 y 25%	37
Gráfico N°4: Comparación de acción bactericida en cepa <i>Escherichia Coli</i> (ATCC) 25922 con aceites esenciales a concentración de 100 %, 75 %, 50 % y 25%	39
Gráfico N°5: Comparación de acción bactericida en cepa <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC) 25923 con aceites esenciales a concentración de 100 %, 75 %, 50 % y 25%	42
Gráfico N°6: Lavado de la muestra (zanahoria) con aceite esenciales a distintas concentraciones.	43

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la variedad <i>Citrus aurantium</i> L.	11
Tabla 2. Clasificación taxonomía de la variedad <i>Citrus sinensis</i> L.	12
Tabla 4. Concentraciones de los aceites esenciales	16
Tabla 5. Guía para la preparación de los distintos estándares de McFarland.....	20
Tabla 7. Escala de Duraffourd para determinar el efecto inhibitorio según el diámetro de inhibición	31

CAPITULO I:

Aspecto Generales

1.1. Introducción

En Nicaragua no se cuentan con estudios sobre bactericidas de origen orgánicos para el lavado de frutas y verduras, que reduzcan la carga microbiana; dado que la mayoría de las infecciones son causadas por consumir alimentos contaminados, los métodos de limpieza más utilizados se basan en procesos físicos y químicos. Entre los métodos físicos podemos mencionar la remoción mecánica y los tratamientos térmicos, entre los métodos químicos de desinfección superficial para tratar frutas y vegetales se encuentran los productos clorados.

En la presente investigación se realizó la extracción de aceites esenciales de semillas de la variedad *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, y *Citrus reticulata L.*, utilizando el método de Soxhlet determinando rendimiento volumétrico obtenido por cantidad de semillas expuesta al método y sus propiedades bactericidas.

Se eligieron las cepas *Escherichia coli* (ATCC) 25922 y *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923, por ser representativas para Gram (+) y Gram (-), la acción bactericida de los aceites esenciales a las distintas concentraciones se constató mediante los métodos microbiológicos Kirby-Bauer y método modificado de pozos agar. Para constatar la disminución de la carga microbiana en el lavado en frutas y verduras se realizó mediante el método de Conteo en placas.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

1.2. Planteamiento del Problema

La OMS, (2007). Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos, p. 4.

Francia. “Señala que los alimentos insalubres contienen bacterias y representan un problema de salud para el ser humano”. Por esta razón, resulta realmente importante lavar la fruta y la verdura antes de consumirla para evitar el riesgo de sufrir ciertas enfermedades. Es posible que para cosechar estos alimentos se hayan contaminado a causa de aguas residuales.

Según la OMS, estima que el 60 por ciento de los brotes de enfermedades son transmitidas por alimentos contaminados entre las principales bacterias que pueden encontrarse en estos alimentos son *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

En el presente trabajo se pretende comprobar la acción bactericida de los aceites esenciales *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.* *Citrus reticulata L.*, en lavado de frutas y verduras que suelen ser susceptibles a la contaminación por una gran variedad de bacterias, algunos de los cuales se producen durante el almacenamiento, transporte y/o procesamiento. Y visualizar si hay una disminución de carga microbiana.

En Nicaragua no se encuentran investigaciones similares donde se compruebe la acción bactericida del aceite esencial de las semillas *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, y *Citrus reticulata L.*, solo referencias internacionales. Por lo tanto, para plantear el Problema de investigación se formula la siguiente pregunta: ¿Los aceites esenciales de las semillas *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, y *Citrus reticulata L.*, reducen la carga microbiana que se encuentra en frutas y verduras?

1.3. Justificación

En Nicaragua existe una gran variedad de industrias y comercios que distribuyen y procesan frutas y verduras que buscan disminuir los riesgos de contaminación, de ahí surge la idea de investigar sobre la acción bactericida de los aceites esenciales *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, y *Citrus reticulata L.*, en lavado de frutas y verduras que ayude a disminuir la carga microbiana, de esta manera beneficiar al sector industrial y comercial, de manera indirecta a los consumidores.

Las frutas y verduras pueden ser un vehículo de transmisión de microorganismos y por tanto tienen consecuencia en la salud de los consumidores. El adquirir una enfermedad por alimentos contaminados con bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* ha hecho que se reconozca la necesidad de someter a tratamientos térmicos y químicos los alimentos para preservar su inocuidad y calidad. Al presente se conocen muchas técnicas de desinfección para el control e inhibición de microorganismos que preservan los alimentos, tales como tratamientos térmicos, ultravioleta y químicos.

Por lo tanto, en la presente investigación se evaluó la actividad antimicrobiana de tres aceites esenciales *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, y *Citrus reticulata L.*, en cepas de referencia *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 y *Escherichia coli* (ATCC) 25922 a través del Método Kirby Bauer y Método modificado en pozos de agar. Y para el lavado de frutas y verduras mediante la técnica de recuento por placas. El método utilizado para la extracción de los aceites esenciales de semillas de las variedades *Citrus*, es de fácil manipulación, una vez extraídos estos aceites esenciales se comprobará la acción bactericida, mediante los métodos microbiológicos antes mencionados.

1.4. Objetivos de Investigación

1.4.1. Objetivo General

Comprobar la acción bactericida presentes en el aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA

1.4.2. Objetivos Específicos

1. Determinar el rendimiento de aceite esencial por el método de Soxhlet a partir de semillas de las variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.* y *Citrus reticulata L.*
2. Probar la acción bactericida presentes en los aceites esenciales de semillas de las variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.* y *Citrus reticulata L.*, en cepas de referencia *Escherichia coli* (ATCC) 25922 y *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923.
3. Constatar la eficacia de los aceites esenciales de semillas de las variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.* y *Citrus reticulata L.*, en el lavado en frutas y verduras.

CAPÍTULO II

2.1. Antecedentes:

En el contexto nacional no se encuentran estudios similares al tema en estudio, por lo tanto, se tomaron como referencia antecedente Internacionales:

Picón Forondo, (2013). *Capacidad antimicrobiana de subproductos cítricos de limón, naranja y mandarina frente a Escherichia coli 0157:h7 y salmonella typhimurium.* (Tesis de grado). **Universidad Politécnica de Valencia.** En su estudio sobre “La efectividad bactericida/bacteriostática que presentan los subproductos cítricos”; el subproducto *Citrus reticulata* destaca en efectividad para bacterias *S. typhimurium* y *Salmonella* inhibe el crecimiento a concentraciones 0,5, 1,5 y 10% p/v. En cuanto al subproducto *Citrus sinensis*, presenta propiedades bactericidas frente a *S. typhimurium* a las mismas concentraciones.

Da Silva, (2015). *Determinación de la actividad antibacteriana de tres variedades de limón.* (Tesis de grado). **Universidad, Ciencia y Sociedad.** Demostró en su estudio sobre las propiedades antimicrobianas de subproductos cítricos; mandarina, naranja y limón, frente a dos patógenos de especial interés para la industria agroalimentaria *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* los subproductos presentan efecto bacteriostático y/o bactericida bajo las condiciones estudiadas, siendo el subproducto de mandarina y limón los más efectivos a concentraciones de 2, 5 y 10%. Pudiendo actuar como barrera a la proliferación microbiana.

Martínez, Sulbarán de Ferrer, Ojeda de Rodríguez, Ferrer y Nava. (2003). *Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina.* **Revista de la Facultad de Agronomía.** En su estudio sobre “Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina”, en cepas bacterianas que se utilizaron para determinar la actividad antibacteriana fueron: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (ATCC) 259923, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC) 27853, y *Escherichia coli* (ATCC) 25922. La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar utilizando las siguientes concentraciones de aceite: 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%. El aceite esencial presentó actividad antibacteriana del tipo bactericida contra las cepas en estudio.

2.2. Marco Teórico

2.2.1. Especie Vegetal: (*Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.* y *Citrus reticulata L.*)

2.2.1.1. Descripción General:

En Nicaragua, el género citrus está conformado por 3 especies principales (*Citrus sinensis L.*, *Citrus lima* y *Citrus reticulata L.*), con diversas variedades que dependen de la región en que se cultive cada una de ellas.

Las semillas derivan de los óvulos a través de los diversos procesos de desarrollo que estos sufren. Presentan una amplia variación en cuanto a tamaño, peso, forma, color y homogeneidad. Sin embargo, existen características comunes dentro de cada especie; por ejemplo, las semillas del limón suelen ser pequeñas, redondeadas y puntiagudas. También hay variedad en cuanto al número de semillas por fruto, factor que puede cambiar ligeramente de un año a otro en función de la polinización y otros factores externos.

2.2.1.2. La naranja consta de: Corteza o exocarpo; Corteza blanca o mesocarpo, Endocarpo o pulpa y Semillas.

Exocarpo: es la corteza exterior de color naranja con pequeñas vesículas o burbujas casi imperceptibles que contienen el aceite esencial aromático de la fruta, es muy rico en flavonoides, se usa en cocina y en herboristería por su delicioso aroma, sus propiedades aperitivas, sedantes y protectoras de los vasos sanguíneos. (Figura 1)

La corteza de naranja puede utilizarse fresca o seca, en guisos, infusiones, decocción, pastelería; si se emplea junto con la parte blanca puede llegar a amargar.

Mesocarpo: es la parte blanca de la corteza, la corteza interna, es muy rica en pectina, una fibra vegetal que sabemos tiene propiedades anticancerígenas y que reducen los niveles de colesterol. (Figura 1)

Endocarpo: es la pulpa jugosa, es la parte más apreciada en la mesa, la comestible por excelencia. La pulpa de la naranja es también muy rica en pectina y otros tipos de fibra vegetal, por lo que es bueno comer las naranjas con su fibra, si se prefiere disfrutar del zumo es mejor no pasarlo por el colador. (Figura 1)

Las Semillas: de la naranja producen un aceite amargo, viscoso y amarillo rico en limonoides, hesperidina y ácidos grasos de alto valor dietético, similares a la composición de la capa grasa de nuestra piel. (Figura 1)

Figura 1: Partes de las variedades *Citrus*



2.2.1.3. *Citrus. aurantium. L.*

Árbol de tamaño medio a grande, frondoso, con hábito de crecimiento abierto, aunque algo más erecto que el naranjo dulce; más rústico y resistente. Con presencia de espinas. Hojas elípticas de tamaño medio a grande con el margen entero y con pecíolo de mayor longitud que el del naranjo dulce y con alas desarrolladas. Flores de tamaño medio, con pétalos blancos y anteras amarillas. Desprenden una apreciada fragancia debida a los aceites esenciales presentes, conocidos como aceite de neroli. Generalmente, los frutos son de tamaño medio y forma esférica, globosos, aunque también se pueden encontrar frutos algo achatados. Presentan una ligera depresión tanto en la zona basal como en la zona apical. La corteza, de color naranja intenso en la madurez, es gruesa y rugosa al tacto. Pulpa jugosa, de color naranja pálido, ácida y con un característico sabor amargo. Eje central semisólido que, una vez alcanzada la madurez, se vuelve hueco. Presencia de numerosas semillas, poliembriónicas, con la chalaza de color púrpura. **Ancillo y Medina (s.f.). Los Cítricos. Jardín Botánico de la Universidad de Valencia. 7-79.**

En la tabla 1. Se pueden apreciar que la variedad *Citrus.aurantium.L.*, posee la siguiente clasificación taxonómica.

Tabla 1. Clasificación taxonómica

Nombre Científico:	<i>Citrus aurantium L</i>
Reino	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Sapindales
Familia:	Rutaceae
Subfamilia:	Aurantioideae
Tribu:	Citreae
Género:	<i>Citrus</i>
Especie:	<i>C.aurantium.</i>

Fuente: (EcuRed, 2017)

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

2.2.1.4. *Citrus. sinensis. L.*

Los árboles de naranjo dulce tienen un hábito de crecimiento abierto. De tamaño medio a grande, vigorosos. Con presencia de espinas, en cantidad variable según la variedad. Hojas elípticas grandes o medianas, de pecíolo corto y con presencia de alas rudimentarias. Margen del limbo entero. No desprenden aroma al ser estrujadas. La flor del naranjo (azahar) es de tamaño mediano, con pétalos blancos y anteras amarillas. Generalmente, los frutos son globosos, de tamaño medio y color naranja. Corteza de espesor medio, lisa y de una adherencia moderada. Eje central sólido o semisólido. Pulpa jugosa, tierna, de color amarillo, naranja. Presencia de semillas en mayor o menor número; son poliembriónicas, con cotiledones blancos. El zumo, abundante, tiene una excelente calidad gracias al equilibrio entre azúcares y acidez; su color cubre todos los tonos desde el naranja pálido al rojo sangre. **Ancillo y Medina (s.f.). *Los Cítricos*. Jardín Botánico de la Universidad de Valencia. 7-79.**

En la tabla 2. Se pueden apreciar que la variedad *Citrus.sinensis.L.*, posee la siguiente clasificación taxonómica

Tabla 2. Clasificación taxonomía

Nombre Científico:	<i>Citrus sinensis L</i>
Reino	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Sapindales
Familia:	Rutaceae
Subfamilia:	Aurantioideae
Género:	<i>Citrus</i>
Especie:	<i>Citrus sinensis (L.) Osb.</i>

Fuente: (EcuRed, 2017)

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

2.2.1.5 *Citrus. reticulata. L.*

Árbol vigoroso de tamaño medio, tupido, hábito de crecimiento abierto y con pocas espinas. Brotación verde y glabra. Las hojas son medianas, de forma elíptica, prácticamente sin alas y con el margen entero. Su aroma al estrujarlas es el típico de mandarina. Flores pequeñas, de pétalos blancos y anteras amarillas. El fruto es pequeño, de forma achatada, presentando una depresión tanto en la base como especialmente en la zona apical, donde es muy pronunciada. La corteza fina y aromática tiene un color naranja intenso; de fácil pelado. La pulpa, cuyo eje central es hueco y grande, es tierna, de color naranja pálido y contiene semillas, poliembriónicas y con cotiledones verdes. El porcentaje de zumo es bajo y con un gran contenido en ácido. **Ancillo y Medina (s.f.). Los Cítricos. Jardín Botánico de la Universidad de Valencia. 7-79.**

La variedad *Citrus.reticulata.L.*, posee la siguiente clasificación taxonómica, la cual se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación taxonomía

Nombre Científico:	<i>Citrus reticulata</i> L.
Reino	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Sapindales
Familia:	Rutácea
Subfamilia:	Citroideae
Tribu:	Citreae
Género:	<i>Citrus</i>
Especie:	<i>Citrus reticulata</i> L.

Fuente: (EcuRed, 2017)

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

2.2.2. Generalidades de los Aceites Esenciales

2.2.2.1. Definición:

El aceite esencial estudiado en esta investigación, se obtiene del género *Citrus*, de la importante familia de las Rutáceas. Los citrus pertenecen botánicamente al orden de los Geraniales, familia de las Rutáceas y a los géneros *Citrus.aurantium.L.*, *Citrus.sinensis.L.* y *Citrus.reticulata.L.* (Ortuño Sánchez (2006). **Manual Práctico de los Aceites Esenciales, aromas y Perfumes. AIYANA. p.7-21**

Define los aceites esenciales como mezclas complejas de hidrocarburos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonilos, aldehídos aromáticos y fenoles que se encuentran en hojas, cáscaras o semillas de algunas plantas.

Los aceites esenciales son productos naturales aplicados en diferentes industrias, como son la farmacéutica, alimenticia, en perfumería, entre otros usos. Actualmente, se constituyen en productos alternativos para la elaboración de biopesticidas o bioherbicidas.

Comúnmente las plantas más jóvenes producen una mayor cantidad de aceite que las plantas de mayor edad. Las plantas de mayor edad dan como resultado aceites más oscuros y resinosos, debido a la evaporación continúa de las fracciones más ligeras del aceite. Al igual que las plantas en la etapa de florecimiento producen una mayor cantidad de aceite en comparación con las plantas después de florecer y cuando éstas brotan.

La composición de un aceite esencial puede variar dependiendo de la época de recolección de la planta, el lugar geográfico o pequeños cambios genéticos.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

2.2.3. Método de Extracción Aceite Esencial de semillas *citrus* por el Método

Soxhlet

En esta investigación se seleccionó como solvente el etanol al 99 %. Se optó por el uso de este por su disponibilidad y menor toxicidad. El equipo Soxhlet consiste en recircular los vapores condensados con ayuda de un sifón a la fuente del solvente que se encuentra en evaporación continua, arrastrando consigo los principios activos de la materia prima contenido en los cartuchos.

2.2.3.1. Etapas de la Extracción de Soxhlet

Para la extracción con el equipo Soxhlet se deben tener en cuenta: la selección del solvente, la matriz sólida y las condiciones de operación. **Anexos 1**

2.2.3.2. Características del solvente

El compuesto químico etanol, conocido como alcohol etílico, es un alcohol que se presenta en condiciones normales de presión y temperatura como un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78 °C y punto de fusión de - 114,1 °C. Es altamente inflamable, soluble en agua en cualquier proporción, reacciona violentamente con oxidantes fuertes y lentamente con hipoclorito cálcico, óxido de plata y amoníaco. **(Caldas Ávila, 2012)**

2.2.3.3. Condiciones de operación

Durante la extracción en el Soxhlet, para recuperar el solvente en nuestro caso se emplea el método de evaporación en el mismo equipo Soxhlet, tomando en cuenta que primero se debe eliminar y/o sacar del equipo extractor el cartucho de muestra, de esta forma se producirá la evaporación del solvente el cual se condensará posteriormente en el extractor, a la vez que también se producirá la concentración del aceite esencial en el balón.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

2.2.3.4. Características de la matriz

La extracción con Soxhlet depende fuertemente de las características de la matriz y de las dimensiones de las partículas puesto que la difusión interna puede ser el paso limitante durante la extracción. Partiendo de esto se puede decir que se necesitará un menor tiempo de extracción con una buena eficiencia si el tamaño de partícula es menor mientras que si las dimensiones de las partículas son mayores la extracción se realizará en un mayor tiempo. (Caldas Ávila 2012).

2.2.3.5. Preparación de las diferentes diluciones del aceite esencial *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.* y *Citrus reticulata L.*

Una vez se obtuvieron los aceites esenciales, se procedió a realizar las diluciones, utilizando como solvente un emulsionante (Polisorbato tween 80).

Los datos para realizar las concentraciones al 25%, 50%, y 75% de los aceites esenciales *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.* y *Citrus reticulata L.*, se resolvió mediante una regla de tres. Se muestran en la siguiente tabla. **Anexos 1, Ecuación 1: Regla de tres para preparar diluciones** en la cual se elaboró una dilución de 10 ml en total, siendo éste el 100%, resultado es la concentración pura en mililitros.

Tabla 4. Concentraciones de los aceites esenciales

Volumen del aceite esencial (mL)	Volumen del emulsionante (mL)	Volumen final (mL)	Contracción (%)
2,5	7,5 mL	10	25
5,0	5,0 mL	10	50
7,5	2,5 mL	10	75
10	-	10	100

a. **Concentración 100%:** 10,0 mL de los aceites esenciales *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.* y *Citrus reticulata L.*

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

b. Concentración 75%: 7,5 mL de los aceites esenciales *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L. y *Citrus reticulata* L. con 2,5 mL Polisorbato tw80, dando un total de 10,0 mL.

c. Concentración 50%: 5,0 mL de los aceites esenciales *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L. y *Citrus reticulata* L. con 5,0 mL de Polisorbato tw80, dando un total de 10,0 mL.

d. Concentración 25%: 2,5 mL de los aceites esenciales *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L. y *Citrus reticulata* L. con 7,5 mL de Polisorbato tw80, dando un total de 10,0 mL.

2.2.4. Descripción de las cepas de referencia

2.2.4.1. Cepas ATCC

Se define como una herramienta indispensable y eficaz para el control de calidad interno en tus cultivos de microbiología. Las cepas ATCC (American Type Culture Collection), son microorganismos certificados para el control de calidad en microbiología y es utilizado en disciplinas como la clínica, alimenticia, farmacéutica, cosmética o ambiental. Sus características genotípicas y fenotípicas garantizan la identidad del microorganismo y al tener esta documentación, el laboratorio evitará realizar pruebas adicionales para la identificación de las cepas, lo que se traduce en ahorro de tiempo y recursos. **(Montoya Romero, 2012)**

2.2.4.2. Cepas de Referencia

Es un material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes. **(Montoya Romero, 2012)** Las cepas son utilizadas al fin de demostrar la trazabilidad, las cepas de referencia deben obtenerse directamente de una colección con la reseña nacional o internacional de cultivo de referencia reconocido. "ISO: 2000" son microorganismos definidos, por lo menos a nivel de género y especie, catalogados, caracterizados y de origen conocido. Adquisición de las cepas de referencia debe ser de obtención directa a partir de una colección nacional e internacional reconocida como la ATCC: American Type Culture Collection. Rockville, EU CCTM.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

2.2.4.3. *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria presente habitualmente en el intestino de personas y animales sanos, formando parte de la flora bacteriana. La mayoría de las cepas son inocuas, pero algunas pueden causar graves intoxicaciones alimentarias a través del consumo de alimentos, como la *Escherichia coli* minoritariamente, también se puede transmitir a través del contacto directo con animales portadores o personas infectadas.

Gran parte de las infecciones causadas por *Escherichia coli*, ocurren en el hogar principalmente asociadas al consumo de carne cruda o poco cocinada, leche cruda y derivados elaborados con ella, frutas y verduras crudas y semillas germinadas.

Para evitar este riesgo, se recomiendan buenas prácticas de higiene y manipulación en la preparación de alimentos, así como cocinarlos bien, ya que *Escherichia coli* se destruye con tratamiento térmico. También es muy importante no romper la cadena de frío en el transporte y conservación de los alimentos desde la compra hasta el hogar.

Vías de transmisión

- **Alimento/Agua-alimento:** Por contaminación cruzada en las explotaciones, en la transformación de los alimentos, y en la preparación y cocinado de los alimentos en el hogar.

2.2.4.4. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

Staphylococcus aureus es un género de bacterias anaerobias Gram-positivas productoras de enterotoxinas termoestables ampliamente distribuida en el medio ambiente y presente en las mucosas de los animales y personas, transmitiéndose al ser humano a través de alimentos contaminados, generándole una toxiinfección alimentaria.

Pueden transmitirse a una amplia gama de alimentos, principalmente alimentos derivados de animales (leche, carne y huevos y los productos derivados) y alimentos consumidos en crudo (frutas y verduras, etc.).

Staphylococcus aureus es una de las bacterias patógenas humanas formadoras de toxinas más resistente y puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en un ambiente seco, y son muy persistentes en alimentos con contenido alto en sales y azúcares. Asimismo, sus

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

toxinas son altamente estables, y resistentes al calor, congelación e irradiación, por lo que una vez formadas en el alimento, es extremadamente difícil eliminarlas.

Vías de Transmisión:

Las toxinas estafilocócicas se pueden transmitir a las personas a través del consumo de alimentos contaminados por falta de higiene e inadecuadas, prácticas de cocinado y conservación:

- **Contaminación cruzada:** en las fases posteriores de transformación de los alimentos, y en la preparación y cocinado de los alimentos en el hogar.
- **Personas:** Los manipuladores de alimentos pueden ser portadores de *Staphylococcus aureus*, de forma que, al preparar los alimentos, sin tener en cuenta unas buenas prácticas de higiene y conservación, contaminan los alimentos.
- **La toxiinfección alimentaria:** Las enterotoxinas estafilocócicas son causa frecuente de un número elevado de brotes de toxiinfección alimentaria. Los síntomas característicos de la intoxicación estafilocócica son náuseas, vómitos, dolores estomacales y abdominales y ocurren rápidamente (1-6h) tras la ingesta del alimento contaminado. **elika (2013). *Staphylococcus aureus*. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. Recuperado de http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento95/7.Staphylococcus.pdf**

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

2.2.5. Método para evaluar la acción bactericida de los aceites esenciales

2.2.5.1. Preparación de Escala McFarland

La escala McFarland consiste básicamente en una serie de tubos estandarizados que contienen una suspensión de un precipitado fino que se asemejan a suspensiones bacterianas en opacidad. Los estándares que se utilizan son precipitados de Sulfato de bario que se obtiene al mezclar Cloruro de Bario con Ácido Sulfúrico, el estándar de McFarland se utiliza como referencia para ajustar la turbidez de las suspensiones bacterianas hasta que el número de bacterias alcanza un rango predeterminado, especialmente para las pruebas de susceptibilidad bacteriana. Guía para la preparación de los distintos estándares de McFarland se muestran en la tabla 5.

Además, es recomendable agitar vigorosamente con Vortex o manualmente el estándar antes de su uso para lograr una turbidez homogénea.

Tabla 5: Estándares de McFarland

Tubo	BaCl ₂ 1% (mL)	H ₂ SO ₄ 1% (mL)	Concentración UFC/mL
0,5	0,05	9,95	$1,5 \times 10^8$
1	0,1	9,9	$3,0 \times 10^8$
2	0,2	9,8	$6,0 \times 10^8$
3	0,3	9,7	$9,0 \times 10^8$
4	0,4	9,6	$1,2 \times 10^9$
5	0,5	9,5	$1,5 \times 10^9$

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

2.2.5.2. Método de Kirby–Bauer o difusión de discos

Para evaluar la actividad bactericida del aceite esencial, se aplicó método de Difusión en Agar o Método Kirby-Bauer. Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido, y posteriormente se evidencia por la formación de halos de inhibición.

1. El medio estándar es el agar de Mueller-Hinton.
2. El plato Petri es inoculado rayando la superficie entera en tres planos con hisopo de algodón estéril introducido previamente en un inóculo estandarizado.
3. El inóculo bacteriano se prepara a partir de un cultivo del microorganismo que se pretende probar y se estandariza con solución salina fisiológica estéril.
4. Sobre la superficie del agar colocar discos de papel estándar que contiene cantidades conocidas de los agentes a probar.
5. El plato Petri se incuba en posición invertida a 37° C durante 18 y/o 24 horas.
6. Para cada disco se mide el diámetro de la zona de inhibición producida por el fármaco (Gentamicina)
7. El aislado bacteriano se designa como sensible, moderadamente sensible o resistente, a través de comparaciones entre el diámetro de la zona estándar suministrado por el fabricante de cada disco. **Rodríguez Cavallini, Gamboa Coronado, Hernández Chavarría y García Hidalgo. (s.f.)**

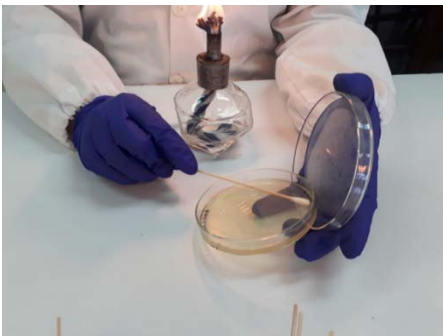


Figura 2: Inoculación del medio

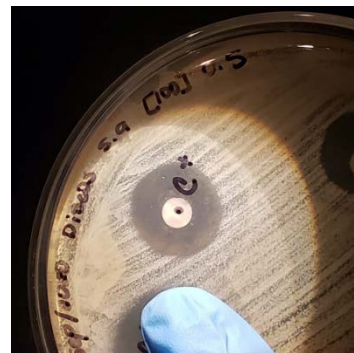


Figura 3: Formación de halos inhibitorios

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

2.2.5.3. Método modificados en pozos agar

El agar Mueller-Hinton se inoculó masivamente en la superficie con la suspensión bacteriana y los controles (turbidez equivalente al patrón 0,5 McFarland), y se esperó 15 minutos para permitir la absorción de este en la superficie del medio. Con un sacabocados estéril se perforó el medio de cultivo buscando obtener un pozo de 6 mm de diámetro, con bordes uniformes y hasta el fondo de la caja de Petri. Se evaluó los aceites esenciales por caja, un pozo por concentración del mismo; en cada pozo se inocularon 5,0 µL de la dilución del aceite esencial a probar, usando un pozo para el control negativo y otro para el control positivo. Los medios fueron incubados a una temperatura aproximada de 37°C durante 18 y/o 24 horas. Finalmente se realizó la lectura de la susceptibilidad antimicrobiana, por observación y medición del halo de inhibición alrededor de cada pozo. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada aislamiento bacteriano.

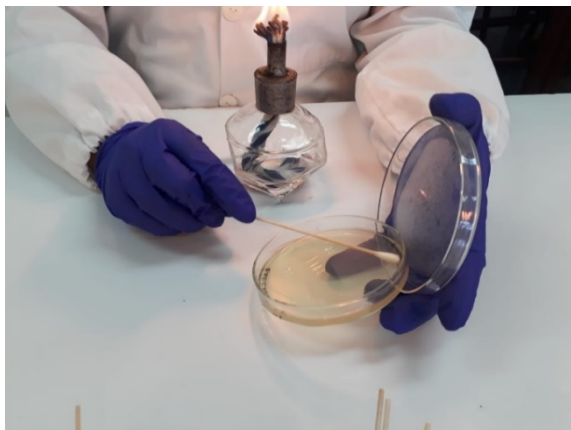


Figura 4: Inoculación del medio.



Figura 5: Adición de los aceites esenciales

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

2.2.6. Preparación de medios

2.2.6.1. Método de Kirby–Bauer o difusión de discos

Se realizó el frotis sobre cada una de la superficie de los agares Mueller-Hinton con las cepas de referencia *Escherichia coli* (ATCC) 25922 y *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923. Luego se colocaron los discos de papel filtro (Whatman) y se vertieron 5,0 µL de cada uno de los aceites esenciales a las diferentes concentraciones, y control positivo (Gentamicina 10 µg/mL) y control negativo (Polisorbato tween 80,) la prueba se realizó por triplicado. Las placas se incubaron invertidas a $35 \pm 2^\circ$ C por 24 horas Posteriormente, se midieron los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos. **Anexos 3 Anexos 2 Ilustración N° 2: Método Kirby-Bauer**

2.2.6.2. Método de difusión en Pozos

Se hizo el frotis del inóculo sobre cada una de las superficies de los agares con las cepas de referencia *Escherichia coli* (ATCC) 25922 y *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923. Posteriormente, se hicieron los pozos sobre la superficie de los agares con ayuda de un sacabocados estéril de 7 mm de diámetro, y en cada uno de ellos se vertieron 5,0 µL de cada uno de los aceites esenciales a distintas concentraciones, control positivo (Gentamicina 10 µg/mL) y control negativo (Polisorbato tween 80) se dejó reposar por 30 minutos y se sellaron los pozos con el agar solidificado con ayuda de un sacabocados. La prueba se realizó por triplicado. Posteriormente, se incubaron y leyeron las placas de igual forma que el método Kirby-Bauer. **Anexos 3, Ilustración N° 3: Método de Pozos Agar**

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

2.2.6.3. Método de Técnicas Básicas de conteo en placas

Camacho, Giles, Ortegón, Palao, Serrano y Velázquez. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. Versión para Administrador de Manuales y Documentos.

Plantean que la técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que se desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra en estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC.

Para que las colonias puedan contarse de manera confiable y calcular el número de colonias encontradas equivalentes a 1 mL de solución de agua peptonada utilizada para éste estudio, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra. **Díaz, Barrio Pilar, Darré, López, Cofre, Condori...Alcalde (2014). Análisis Microbiológico de los Alimentos. anmat. Volumen (3) p.17-18**

2.2.6.4. Método de cálculo

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,11 \times d}$$

Donde:

ΣC: Suma de las colonias contadas en dos platos petris de las diluciones consecutivas.

V: Es el volumen de inóculo utilizado en cada plato en mL.

d: dilución correspondiente a la primera dilución elegida.

Para concebir mejor el procedimiento. **Anexos 3, Ilustración N° 4: Método Técnicas Básicas Conteo en Placas**

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

2.3. HIPOTESIS

Los aceites esenciales obtenidos de las semillas de las variedades de *Citrus aurantium* L, *Citrus sinensis* L, *Citrus reticulata* L, poseen acción de inhibir el crecimiento de las bacterias.

CAPITULO III:

Diseño Metodológico

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

3.1. Descripción del ámbito de estudio

En el presente estudio para la obtención de semillas (*Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L.), se llevó a cabo en la Finca “El Almendro” ubicada en Masatepe en la comunidad Campos azules de la escuela Rubén Darío 600 metros al Norte. El proceso de extracción de los aceites esenciales se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis Físico Químico de Alimentos (LAFQA) del Departamento de Química pabellón 3 y los ensayos microbiológicos se realizaron en los laboratorios de Biología pabellón 50 de UNAN-Managua, Recinto Universitario Rubén Darío.

3.2. Tipo de estudio

La presente investigación es del tipo *Experimental*: Se establece en condiciones controladas la relación causa-efecto dado que se van a comparar los aceites esenciales obtenidos de las semillas de las tres variedades del género *Citrus* en cuanto a mayor acción inhibitoria de las bacterias. (Piura López, 2008); Es de cohorte *Transversal*: debido a que se van a tomar los datos en un intervalo de tiempo determinado y analizar su incidencia e interrelación en un momento dado. (Piura López, 2008) *Descriptivo*: Dado que el estudio describe los hechos obtenidos durante la investigación, busca explicar las propiedades que se analizan. y es de enfoque cualitativo: se obtuvieron datos no cuantificables de calidad para la conclusión del proceso. (Hernández Sampieri, Fernández Collado, & Baptista Lucío, 2010)

3.3. Población y muestra

3.3.1. Población

Se considera como población los frutos del género *Citrus* que se han recolectados por un muestreo aleatorio para la obtención de las semillas *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L., en la Finca “El Almendro” ubicada en Masatepe comunidad Campos Azules de la escuela Rubén Darío 600 varas al Norte.

3.3.2. Muestra

Se tomará como muestra se tomaron los aceites esenciales de semillas de las variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L., obtenidos en el laboratorio LAFQA del departamento de química ubicados en el pabellón 3 UNAN- Managua.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

3.3.2.1. Criterios de Inclusión

- Semillas que pertenecen al género *Citrus* como: *C. aurantium* L, *C. sinensis* L, *C. reticulata* L.
- Semillas en buen estado
- Frutas y verduras en buen estado
- Cepas de referencias *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- Aceites esenciales a las distintas concentraciones 100%, 75%, 50% Y 25%. Se trabajó con estas concentraciones ya que se tomó como referencia el estudio de **Martínez, Sulbarán de Ferrer, Ojeda de Rodríguez, Ferrer y Nava. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. Revista de la Facultad de Agronomía.** Utilizan concentraciones desde 10% hasta 100%.

3.3.2.2. Criterios de Exclusión

- Cualquier materia extraña visible en las semillas
- Semillas exentas de plagas que afecten al aspecto general
- Frutas y verduras que recibieron algún tratamiento de lavado antes del ensayo microbiológicos.
- Platos Petri contaminadas durante y después del proceso de esterilización
- Discos contaminados y mal manipulados.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

3.3.3. Variables y operacionalización

3.3.3.1. Variables Independiente

- Aceites esenciales de *C. aurantium L.*, *C. sinensis L.*, *C. reticulata L.*, al 25%, 50%, 75% y 100%
- Disminución de la carga microbiana

3.3.3.2. Variable Dependiente

- Rendimiento de los aceites esenciales
- Efectividad bactericida del aceite esencial a diferentes concentraciones frente a dos cepas de referencia
- Efectividad bactericida del aceite esencial a diferentes concentraciones en el lavado de las frutas y verduras

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Operalización de las variables

Variab	Definición	Indicadores	Escala	Tipo de Clasificación variable	de Clasificación
Rendimiento	Calcular el rendimiento del aceite esencial mediante el volumen de aceite obtenido entre la cantidad de muestra en gramos por 100.	%	Nominal	Cuantitativa	Dependiente
Acción inhibitoria	Diámetro de halo de inhibición (Según las pautas de Duraffourd)	Nula (N) ≤8mm Sensible (S) de 9-14mm Muy sensible (MS) de 15-19mm Sumamente sensible (SS) ≥ 20mm	Nominal	Cuantitativa	Dependiente
Disminución de la carga microbiana	Se medirá el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC)	Incontables >250 colonias Recuento Estimado (menores de 25 colonias)	Nominal	Cualitativo	Dependiente

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

3.3.4. Materiales y métodos

3.3.4.1. Materiales

Instrumentos			
Nombre del Equipo	Marca	Modelo	Resolución
Estufa de convección	J.P. Selecta	2000210	5°C
Balanza Analítica	OHAUS Adventurer Pro	AV114	0,0001g
Campana de gases	Burdinola	OR-ST-1200	-
Autoclave	-	-	-
Incubadora	J.P. Selecta		T ° ambiente + 5°C a 57°C
Vortex	-	-	-
Hot Plate	CORNING	PC-220	
Contador de colonias	-	-	-
Materiales y Cristalería			
Nombre	Especificaciones	Nombre	Especificaciones
Desecador	Agente desecante gel de silicato (reconstituido)	Balón de fondo redondo	Pyrex™ 250/500 mL
Espátula metálica	Acero inoxidable	Tubo extracción Soxhlet	-
Mangueras	Fisherbrand	Condensador Allihn/Serpentín/ Dimroth	-
Pinzas de 3 dedos	-	Beacker	250 mL, 100 mL Pyrex™
Manta calefactora	-	Platos Petris	-
Soporte universal	-	Embudos	vidrio de borosilicato Pyrex™

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Dedales de celulosa	-	Probetas	100 mL, 500 mL Pyrex™
Trozo de algodón	-	Erlenmeyer	250 mL, 1000mL, 125 mL. Pyrex ®
Perlas de ebullición	-		
Pinzas de madera	-	Pipetas Serológicas	
Mecheros	Alcohol		
Guantes de nitrilo	Sin polvo		
Fósforos	-		
Guantes de asbesto	-		
Papel toalla	-		
Papel aluminio	-		
Pinzas puntas planas	-		
Micropipetas	-		
Mortero con pistilo	-		
Azas de siembra bacteriológicas	-		
Gradilla	Acero inoxidable		
Agitadores	-		
Hisopos	Estériles		
Papel filtro	Whatman 1 mm		
Reactivos			
Reactivo	Formula	Grado	Marca
Etanol	C ₂ H ₅ OH	-	-
Agua destilada	H ₂ O	Análisis	-
Agar Hinton Mueller	Formula comercial.	Análisis microbiológico	Bioteología

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Agar Nutritivo	Formula comercial	Análisis microbiológico	Merck
Solución salina	-	-	Merck
Agua peptonada	Formula comercial	-	Merck
Gentamicina 80 µL/mL	160 mg/2 ml contiene gentamicina sulfato equivalente a gentamicina base 160 mg.	gérmenes sensibles a Gentamicina	Merck
Polisorbato tw80	-	Excipiente emoliente lavable	LA SANTÉ®

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

3.3.4.2. Materiales para recolectar la información

- Apuntes
- Tablas de recolección de datos
- Artículos de revistas
- Libros

3.3.4.3. Materiales para procesar la información

Se van a utilizar otras herramientas para procesar información:

- Microsoft Word, versión 20H2, año 2013
- Microsoft Excel, versión 20H2, año 2013
- Microsoft PowerPoint, versión 20H2, año 2013

3.3.4.4. Método

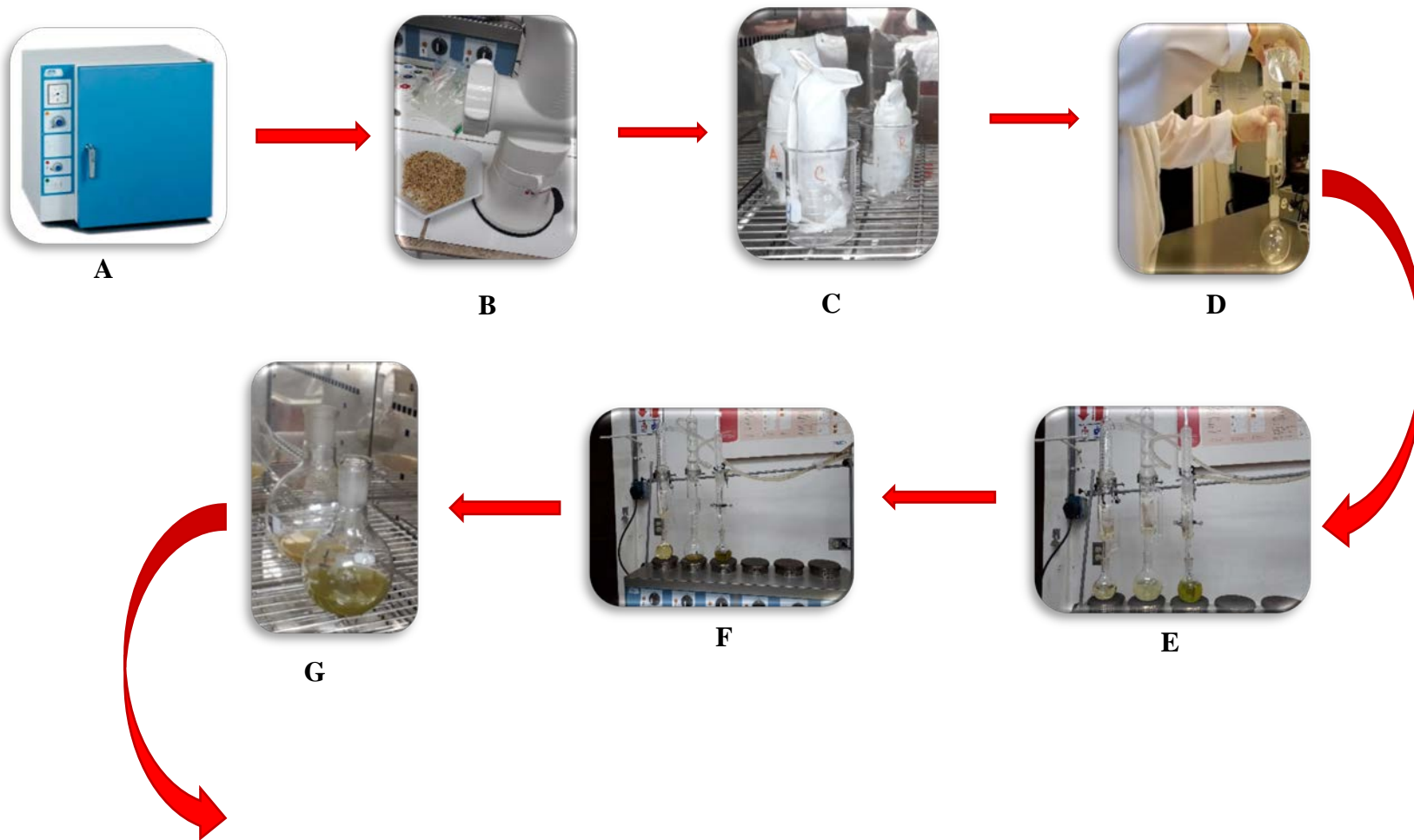
3.3.4.4.1. Procedimiento de recolección y preparación de la muestra

Para la recolección de la muestra en esta investigación, se fue al lugar establecido para la obtener la muestra (Finca “El Almendro” ubicada en Masatepe en la comunidad Campos azules de la escuela Rubén Darío 600 metros al Norte). Para la obtención de la semilla se tomaron 300 frutos de cada variedad, teniendo en cuenta los criterios de exclusión e inclusión establecidos.

Se extrajo las semillas de los distintos cítricos, se lavaron para la variedad *C.a.L* = 118,252 g; *C.s.L* = 1026,843 g; *C.r.L* = 300,88 g y se secaron para eliminar el exceso de agua que contienen, con ayuda de la estufa de convención del laboratorio a una temperatura de 105 °C, la etapa de secado duro 2 horas. Cuando las semillas estuvieron secas, se trituro en un molino manual. Luego fueron pesados en una balanza analítica la cantidad de 25,00 g, de cada variedad por cada extracción realizada sumando un total de cada de muestra en análisis. *C.a.L* = 259,492 g; *C.s.L* = 259,492 g; *C.r.L* = 259,492 g.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

3.3.4.4.2. Diagrama para la obtención de los aceites esenciales. Anexos 5



Bra. Abud Espinoza María Monseratt,
Bra. Gutiérrez Narváez Elieth Antonieta

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.



H



I

- A.** Las semillas se ingresaron a la estufa de convección a 105 °C, la etapa de secado duro 2 horas.
- B.** Una vez seca la muestra se trituró con ayuda de un molino manual.
- C.** Para iniciar la extracción se pesó 25,00 g de la muestra en los dedales de celulosa.
- D.** Se añadió a dos balones de 250 mL, 275 mL del solvente (etanol al 99%), al balón de 500 mL, se le adiciono 475 mL del solvente, se supone que la capacidad de los balones es de 250 y 500 mL, pero se le agrega un excedente para permitir el sifoneo.
- E.** El solvente tiene que llegar a su punto de ebullición, ascendiendo lo vapores por el tubo condensando al refrigerante bajando gota a gota impregnando la muestra que se encuentra en los dedales, cubriendo el dedal hasta que se produce el descenso que vuelve al solvente con el material extraído al balón.
- F.** Se realizaron varias extracciones por la capacidad del método en el cual duro 7 horas. Se extrajo el dedal que contenía la muestra y se recuperó el solvente.
- G.** Se llevó los balones a la estufa de convección a una temperatura de 103 °C por una hora para eliminar el solvente restante.

H. Los aceites esenciales se filtraron.

I. Se almacenaron en un frasco color ámbar para evitar la degradación por la luz.

3.3.4.4.3. Método Kirby-Bauer y Método en Pozos de agar

3.3.4.4.3.1. Preparación de suspensión bacteriana y medio de cultivo

Se pesó 97,92g de agar Mueller-Hinton para 2,880 mL equivalentes a 144 platos petris, se agito por 5 minutos para su disolución completa, se ingresó a la autoclave por 15 minutos a 121 °C para esterilizar luego se vierten sobre los platos Petri y se dejan enfriar a 45 – 50 °C.

Del crecimiento de las bacterias en cepas de referencia se tomaron 3 colonias características y se realiza una suspensión bacteriana de cada una, en 9 mL de solución salina previamente esterilizadas en la autoclave, la turbidez se fijó en 0,5 según el patrón de McFarland.

Posteriormente se procede a la inoculación de las bacterias en los platos ya preparados, se utiliza un hisopo de algodón estéril, se sumerge en la suspensión bacteriana y se inocula pasando uniformemente en 3 direcciones por todo el plato.

Se realizaron 5 pozos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pajilla de acero inoxidable. Para la colocación de los discos con la ayuda de la pinza punta plana estéril fueron colocados en los platos Petri se procedió a colocar 5 µL en cada disco y pozos del aceite esencial de *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., y *Citrus reticulata* L., a las concentraciones 25%, 50 %, 75% y 100%. mediante una micropipeta.

Se realizó el control positivo con Gentamicina 10µg/mL y el control negativo Polisorbato tween 80 que se utilizó como emulsificante de los aceites esenciales.

3.3.4.4.2. Lectura de Resultados

Después de transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la observación y lecturas de las zonas claras de inhibición del crecimiento bacteriano, y se procedió a realizar la medición de los diámetros (mm) de estas zonas.

Para la interpretación de los resultados, como se muestra en la tabla 7, se tomó como referencia la escala de Duraffourd que es utilizada para evaluar cualitativamente el efecto inhibitorio según el diámetro de inhibición. (Duraffourd, Hervicourt, & Lapraz, 1987)

Tabla 7: Escala de Duraffourd

Nula	-	≤ 8mm
Sensible	+	9-14 mm
Muy sensible	++	15-19 mm
Sumamente sensible	+++	≥ 20

3.3.4.4.3. Método de Técnicas Básicas de conteo en placas

Se eligieron como muestras zanahorias y guayabas, ya que puede consumirse cruda al natural, pero también se emplea para la preparación de ensaladas, sopas, jugos y postres, considerando que algunos problemas pueden generarse desde la cosecha y pueden transferirse a otras fases como el procesamiento, empaque, transporte, comercialización e inclusive en la preparación del producto y su consumo.

Se eligieron como muestras la zanahorias y guayabas para el lavado con los aceites esenciales a las distintas concentraciones ya que son de temporada y de consumo en el país.

Se pesó 99,86 g de agar Nutritivo para 4,320 mL equivalentes a 216 platos petris para la muestra de lavado de frutas (guayabas) y verdura (zanahorias) y se preparó 42,12 g de agua peptonada, se agito por 5 minutos para su disolución completa se ingresó a la autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Una vez lavadas las frutas y verduras con los aceites esenciales a distintas concentraciones, se retiraron las cascara de la zanahoria y la guayaba y se pesó 10 g de muestra se homogenizo en el Erlenmeyer de 250 mL que contenía 90 mL de agua peptonada para preparar la solución madre, para preparar las diluciones decimales se empleó en tubos de ensayo 9 mL de agua peptonada.

Para que las colonias puedan contarse de manera confiable y calcular el número de colonias encontradas equivalentes a 1 mL de solución de agua peptonada utilizada para éste estudio, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra. Depositando 1 mL de cada dilución en los platos petris estériles, se agregó 20 mL de agar enfriado a 45°C, la técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que se desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo de la muestra en estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC.

3.3.4.4.4. Lectura de Resultados

Después de transcurrido el tiempo de incubación, contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas, incluyendo las colonias puntiformes. Con ayuda del registrador para conteo de placas.

El cálculo de resultados de cuenta en placa se comparó con el Rango de sensibilidad: 25 a 250 colonias.

CAPÍTULO IV:

Análisis de Resultados

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

4.1. Rendimiento de aceites esenciales en semillas de variedades

Para evaluar el rendimiento se llevó a cabo en base al método gravimetría-volumétrico, (Ceballos, 2012). Define el rendimiento como la cantidad de producto (mL) que se obtiene en relación a la cantidad de muestra utilizada (en gramos).

La variable fue evaluada a través del porcentaje de rendimiento, tomando un peso muestra 25 g en 300 mL de solvente (etanol 99%), el cual permite la extracción del aceite esencial de *C. aurantium L.*, *C. sinensis L.*, y *C. reticulata. L.*, por el método Soxhlet. Los datos mostrados en el gráfico comparan el rendimiento de los porcentajes de extracción.

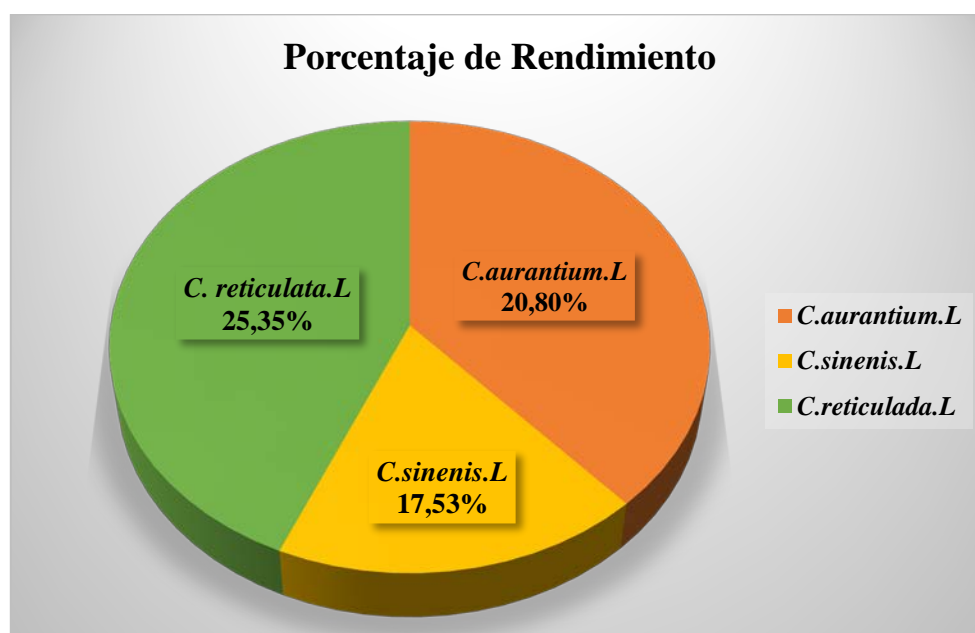


Gráfico N°1: Comparación Porcentaje de Rendimiento de aceites esenciales

El gráfico N°1, muestra el rendimiento expresado en porcentaje, la extracción se realizó por el método Soxhlet, donde se observa que los tres aceites esenciales, utilizando la misma cantidad de muestra, solvente y tiempo de extracción, se obtienen un porcentaje similar de extracción, destacando el 25,35% *Citrus. reticulata. L.*, no obstante, los aceites *Citrus. aurantium. L.*, y *Citrus. sinensis. L.*, se extraen en porcentajes de 20,80% y 17,53% respectivamente. Datos obtenidos en base a cálculo de rendimiento.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Anexos 7. Considerando que el método aplicado para la extracción es efectivo para los tres aceites esenciales en estudio.

Con los datos obtenidos, podemos decir que no es rentable ya que se compró los frutos para la obtención de las semillas, quizás si las semillas se consiguieran de algunas empresas que desechen este subproducto, se mejoraría la rentabilidad para la obtención de las semillas.

4.2. Acción bactericida en cepas referencia *Escherichia coli* (ATCC) 25922

La acción bactericida fue identificada por el método de Kirby-Bauer. Este método permitió conocer a que concentración el aceite esencial puede actuar inhibiendo el crecimiento de la cepa en estudio. Se impregno cada disco con 5µL de las diluciones de los aceites esenciales 100%, 75%, 50% y 25%, como control positivo se eligió Gentamicina de carga 10 µg/mL, los resultados obtenidos de acción bactericida se comparó de acuerdo a actividad antimicrobiana de las pautas de Duraffourd.

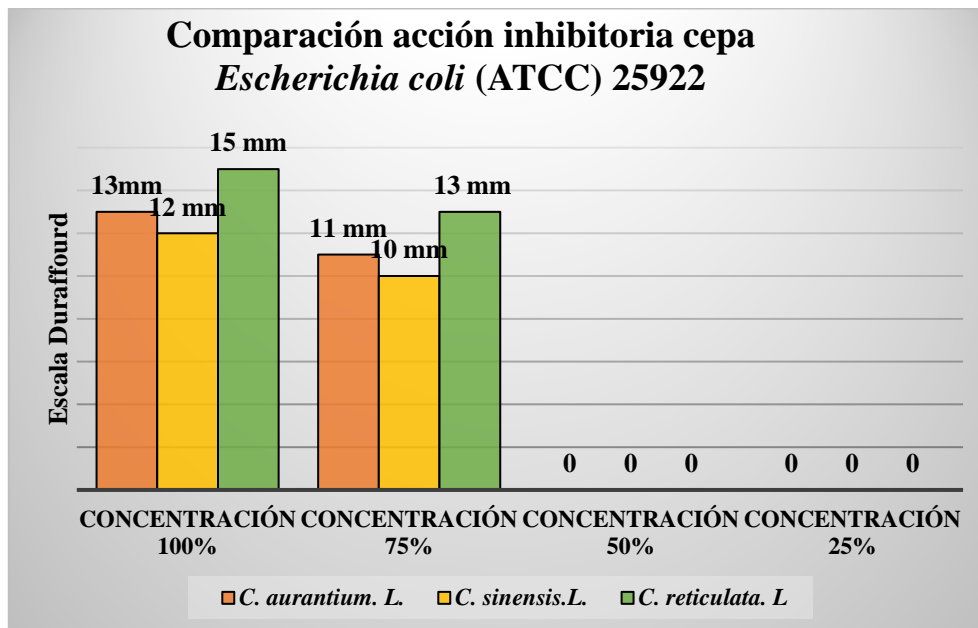


Gráfico N°2: Comparación de acción inhibitoria en cepa *Escherichia coli* (ATCC) 25922 utilizando aceites esenciales a diluciones 100 %, 75 %, 50 % y 25 %

En el gráfico N°2, se comparó mediante método de Kirby-Bauer, y se procedió a la medición de los halos inhibitorios (**Anexos 8**) de todos los platos Petri. Siendo la concentración más

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

efectiva la realizada al 100% un halo promedio de 13 mm, 12 mm, y 15 mm al 75% la efectividad alcanzó un halo de 11 mm, 10 mm y 13 mm de promedio y a concentraciones menores de 50% y 25% no mostraron halos de inhibición y el control positivo Gentamicina 10µg/mL obtuvo un halo promedio de 20 mm.

Basándonos en las pautas de la Escala de Duraffourd del rango de actividad, los aceites esenciales presentaron halos de inhibición *C. aurantium. L.*, 13 mm considerándose **Sensible**, *C. sinensis. L.*, 12 mm **Sensible**, mostrando buenos resultados frente a la cepa la variedad *C.reticulata.L.*, 15 mm **Muy Sensible**.

Así mismo, es necesario recalcar que los aceites esenciales a 75% también presentan acción bactericida frente a la cepa, con los siguientes halos de medición: la variedad *C. aurantium. L* 11 mm **Sensible**, *C. sinensis. L.*, 10 mm **Sensible** y *C.reticulata.L.*, 13 mm **Sensible**.

Anexos 9

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

4.2.1. Acción bactericida en cepas referencia *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923

Los aceites esenciales demostraron una mejor actividad antibacteriana contra la cepa referencia Gram positivo *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923, la acción bactericida se clasificó según el rango de la actividad antimicrobiana de la Escala de Duraffourd. Las variedades presentaron *C. aurantium*. L., 16 mm se considera **Muy Sensible**, *C. sinensis*. L., 15 mm **Sensible**, la variedad *C. reticulata*. L., 17 mm **Muy Sensible** a las concentraciones de 100 %.

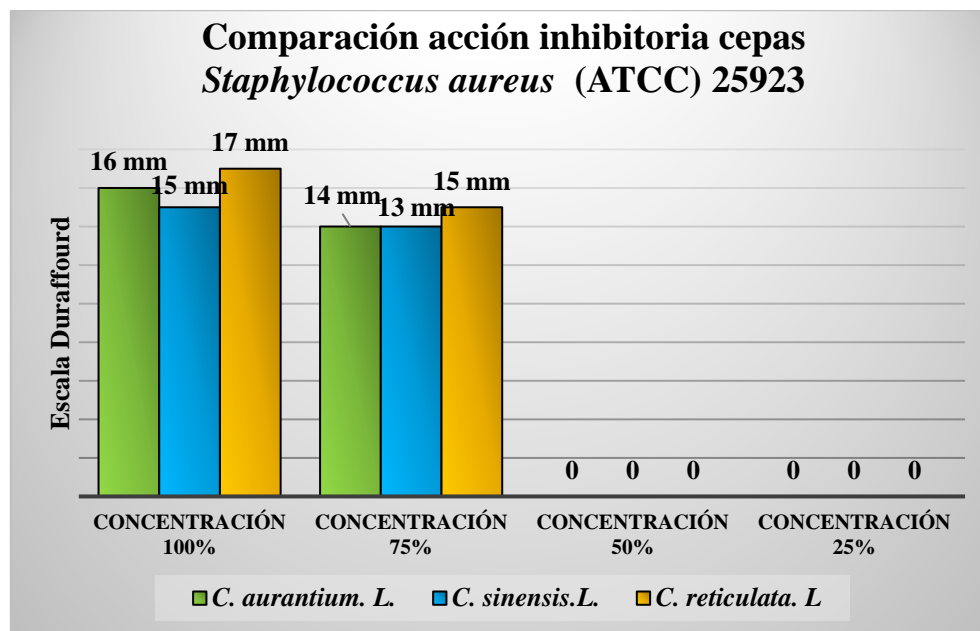


Gráfico N°3: Comparación de la acción inhibitoria en la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 con los aceites esenciales a concentración de 100, 75, 50 y 25%

El gráfico N°3 compara mediante método de susceptibilidad Kirby-Bauer, la medición de los halos de inhibición presentes en los platos Petri. Siendo para concentración al 100% un halo promedio de 16 mm, 15 mm y 17 mm la más efectiva, al 75% la efectividad alcanzó un halo de 14 mm, 13 mm y 15 mm de promedio y a concentraciones menores de 50% y 25% no mostraron halos de inhibición. La Gentamicina 10µg/mL obtuvo un halo promedio de 22 mm.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Mediante las pautas de Escala de Duraffourd del rango de actividad, los aceites esenciales a concentraciones de 100% presentaron halos de inhibición *C. aurantium* L., 16 mm considerándose **Muy Sensible**, *C. sinensis* L., 14 mm **Sensible**, la variedad *C. reticulata* L., 17 mm **Muy Sensible**, mostraron buenos resultados frente a la cepa.

Así mismo, es necesario recalcar que los aceites esenciales a 75% también presentan acción bactericida frente a la cepa, con rango de acción bactericida, la variedad *C. aurantium* L., 14 mm **Muy Sensible**, *C. sinensis* L., 13 mm **Sensible** y *C. reticulata* L., 15 mm **Muy Sensible**. **Anexos 9**

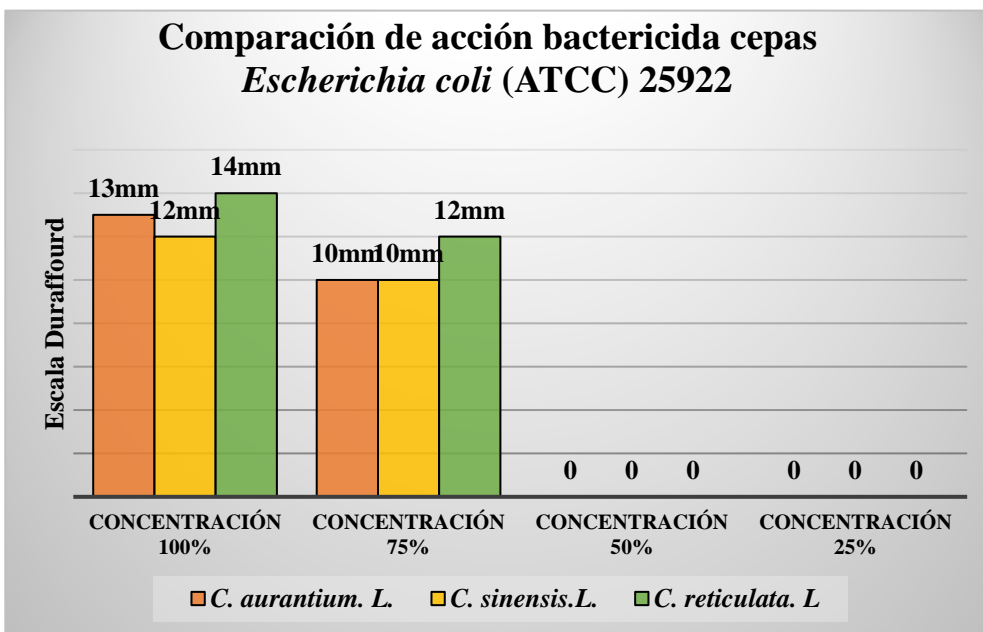
Los resultados obtenidos muestran que no son diferentes a otros estudios que se han realizado en cuanto a inhibición bacteriana, se ha demostrado que las bacterias Gram positivas son más susceptibles a diferentes tipos de aceites esenciales que las bacterias Gram negativas, esto se evidencia claramente en el resultado con la bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 como bacteria Gram positiva; y *Escherichia coli* (ATCC) 25922 fue más resistente frente a las concentraciones propuestas, sin embargo los aceites esenciales *C. aurantium* L., *C. sinensis* L., y *C. reticulata* L., lograron formar halos de la inhibición a concentraciones de 100% y 75%.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

4.3. Acción bactericida en cepas referencia *Escherichia coli* (ATCC) 25922 por método modificados de Pozos en agar

Las pruebas realizadas con los aceites esenciales por el método modificados de pozos agar demostraron actividad bactericida ante la cepa referencia Gram negativo, *Escherichia coli* (ATCC) 25922, la acción bactericida se clasificó según el rango de actividad bactericida de la Escala de Duraffourd.

Con respecto a los aceites esenciales *C. aurantium. L.*, *C. sinensis.L.*, y *C. reticulata. L.*, frente a la cepa posee inhibición, pero no a concentración reducidas de 50 % y 25 %. Podemos observar que el máximo de efectividad inhibitoria se alcanza en la concentración 100%



Gráfico

N°4: Comparación de acción bactericida en cepa *Escherichia coli* (ATCC) 25922 con aceites esenciales a concentración de 100 %, 75 %, 50 % y 25%

En el gráfico N° 4, se comparó mediante métodos modificados de pozos en agar, la medición de los halos inhibitorios (**Anexos 10**) de todos los platos Petri. Siendo la concentración más efectiva la realizada al 100% mostrando un halo promedio de 13 mm, 12 mm y 14 mm al 75% la efectividad alcanzó un halo de 10 mm, 10 mm y 12 mm de promedio y a concentraciones menores de 50% y 25% no mostraron halos de inhibición, el control positivo Gentamicina 10µg/mL obtuvo un halo promedio de 20 mm.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Se base en las pautas de la Escala de Duraffourd del rango de actividad, los aceites esenciales presentaron halos de inhibición *C. aurantium. L.*, 13 mm considerándose **Sensible**, *C. sinensis. L.*, 12 mm **Sensible**, la variedad *C. reticulata. L.*, 14 mm **Muy Sensible** a las concentraciones de 100 %. Así mismo, es necesario recalcar que los aceites esenciales a 75% también presentan acción bactericida frente a la cepa, con los siguientes halos de medición: la variedad *C. aurantium. L.*, 10 mm **Sensible**, *C. sinensis. L.*, 10 mm **Sensible** y *C. reticulata. L.*, 12 mm **Sensible**.

El carácter hidrofóbico de los aceites esenciales le permite atravesar la pared celular de bacterias Gram-negativas a través de canales compuestos por proteínas llamadas porinas, las cuales se encuentran en la membrana externa y facilitan el transporte de nutrientes y sustancias de bajo peso molecular dentro de la célula, incluyendo agentes antimicrobianos.

Los componentes de los aceites esenciales podrían ejercer actividad antibacteriana por interferir en la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular causando el incremento de su permeabilidad y pérdida de los constituyentes celulares, dado que destruye el sistema de enzimas incluyendo las que implican la producción de energía celular (fuerza motriz de protones) y de respiración bacteriana, cuando se trata de concentraciones bajas de los aceites esenciales; mientras que a altas concentraciones provocarían daños severos de los componentes estructurales de la célula bacteriana, como la pérdida de homeóstasis o inactivando o destruyendo el material genético, dando lugar a la muerte celular.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

4.3.1. Acción bactericida en cepas de referencia *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 por el método de Pozos

Mediante el método modificados de pozos en agar sobre la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923, se comparó la actividad bactericida del uso de los aceites esenciales a las distintas concentraciones, los resultados de los aceites esenciales de las variedades *C. aurantium. L.*, *C. sinensis. L.*, y *C. reticulata. L.*, colocándolos en pozos a volúmenes de 5µL, donde la cepa Gram-Positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 posee una actividad significativamente alta de ser atacada en altas concentraciones por los aceites esenciales en estudio, es recomendable utilizar este método para realizar ensayos de actividad antimicrobiana debido a su alta sensibilidad.

Los aceites esenciales demostraron actividad antimicrobiana contra la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923, bacteria que resulto más susceptible a la acción bactericida de los aceites, la actividad bactericida se clasificó según Escala de Duraffourd.

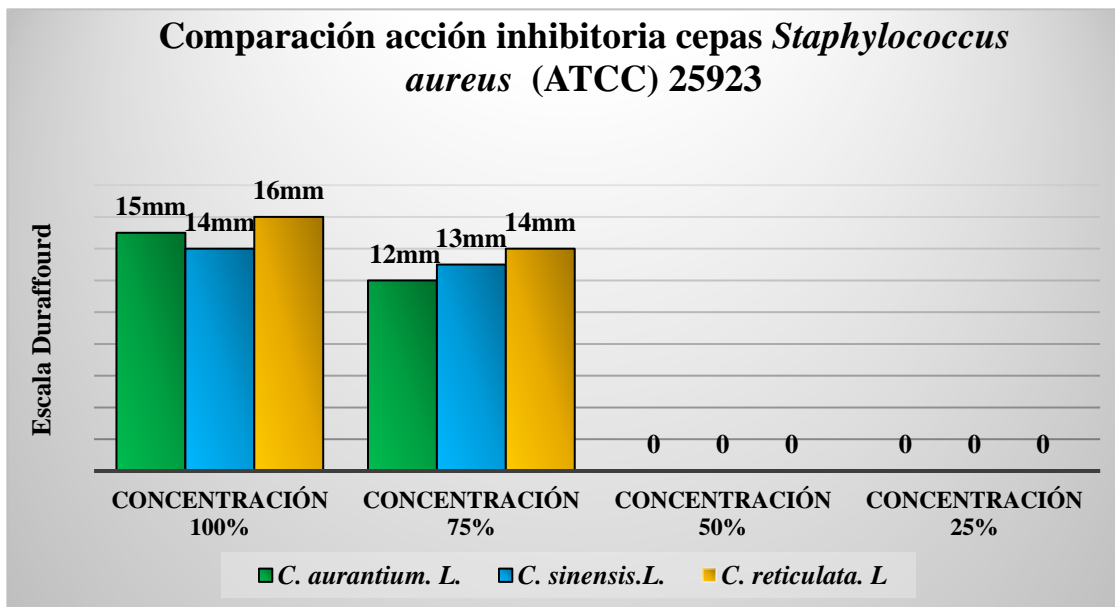


Gráfico N°5: Comparación de acción bactericida en cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 con aceites esenciales a concentración de 100 %, 75 %, 50 % y 25%

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Como se puede apreciar en el gráfico N°5, respecto a los aceites esenciales frente a la cepa posee inhibición, en comparación de resultados se obtuvo la siguiente sensibilidad la variedad *C. aurantium*. L., 15 mm se considera **Muy Sensible**, *C. sinensis*. L., 14 mm **Sensible**, la variedad *C. reticulata*. L., 16 mm **Muy Sensible** a concentraciones de 100 %.

Así mismo, es necesario recalcar que los aceites esenciales a 75% también presentan acción bactericida, presentaron porcentaje de inhibición dado el rango de actividad bactericida, la variedad *C. aurantium*. L., 12 mm **Sensible**, *C. sinensis*. L., 13 mm **Sensible**, mostró mejores resultados la *C. reticulata*. L., 14 mm **Sensible**. Pero a concentraciones menores de 50 % y 25% no presenta acción bactericida. **Anexos 10.**

Cabe resaltar que los aceites esenciales mostraron un mayor efecto inhibitorio frente a cepa Gram- positiva. Este comportamiento probablemente se debe a que la pared celular de las bacterias Gram-positiva estudiada, está compuesta básicamente por peptidoglicano que representa hasta el 90% de la pared celular de la bacteria, la propiedad hidrofóbica de los aceites esenciales permite atravesar la membrana lipídica aumentando su permeabilidad lo que ocasiona la pérdida del contenido celular vital y su posterior muerte.

4.4. Disminución de carga microbiana en lavado verduras (zanahorias) con aceites esenciales.

La prueba realizada con aceites esenciales a distintas concentraciones 100%, 75%, 50% y 25%, para el lavado de la muestra se tomó 5 mL se aplicó directamente y se enjuago con ADE, mediante el método de recuento de colonias en placas, intenta realizar una estimación de la disminución de carga bacteriana que hay en la muestra (**zanahorias**), sin realizar la caracterización macroscópica y bioquímica de las colonias.

La comparación en los resultados de disminución de carga microbiana presente en la muestra se basó como “valor estimado”, el proceso mostrado se basa en la suposición de que un microorganismo “viable” da lugar al desarrollo de una colonia y que el número total de colonias que se desarrolla sobre el medio de cultivo es proporcional al número original de microorganismos “viables” presentes en las muestras.

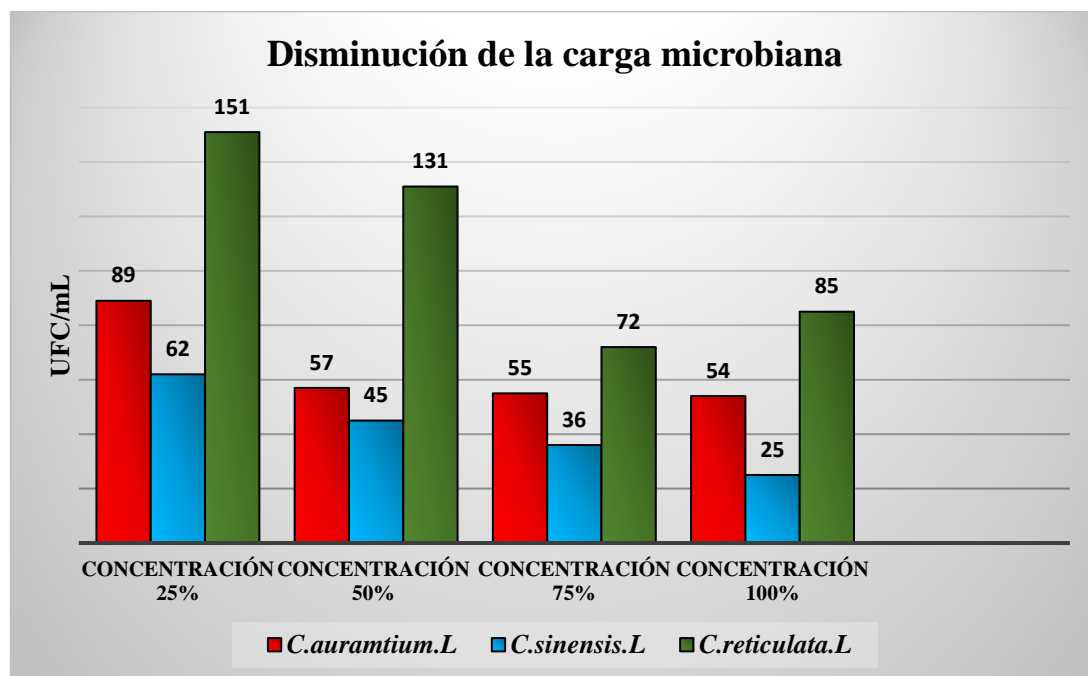


Gráfico N°6: Lavado de la muestra (zanahoria) con aceite esenciales a distintas concentraciones.

La disminución microbiana permitió conocer a que concentración el aceite esencial puede actuar disminuyendo el crecimiento de microorganismos. La muestra se trató con las distintas diluciones 100%, 75%, 50% y 25% de aceites esenciales en estudio se eligió control como

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

positivo Cloro. Como podemos apreciar en el gráfico la muestra al ser tratada con los aceites esenciales, se observa disminución de la carga microbiana, cabe recalcar que todas las concentraciones presentan disminución siendo la variedad *C. aurantium* L., y *C. sinensis* L., quienes presentaron mejores resultados en todas las concentraciones de aceites esenciales en estudio. **Anexos 11 Anexos 12.**

4.4.1. Disminución de carga microbiana en lavado de frutas (guayabas) con aceites esenciales.

La prueba realizada por método de conteo en placas, pretende estimar la disminución de carga bacteriana que hay en la muestra, sin identificar los diferentes tipos de microorganismos capaces de formar la colonia.

El resultado de disminución en la carga microbiana presente en la muestra se basó como “valor estimado”, suposición de que un microorganismo “viable” da lugar al desarrollo de una colonia y el número total de colonias que se desarrolla sobre el medio de cultivo es proporcional al número original de microorganismos presentes en las muestras.

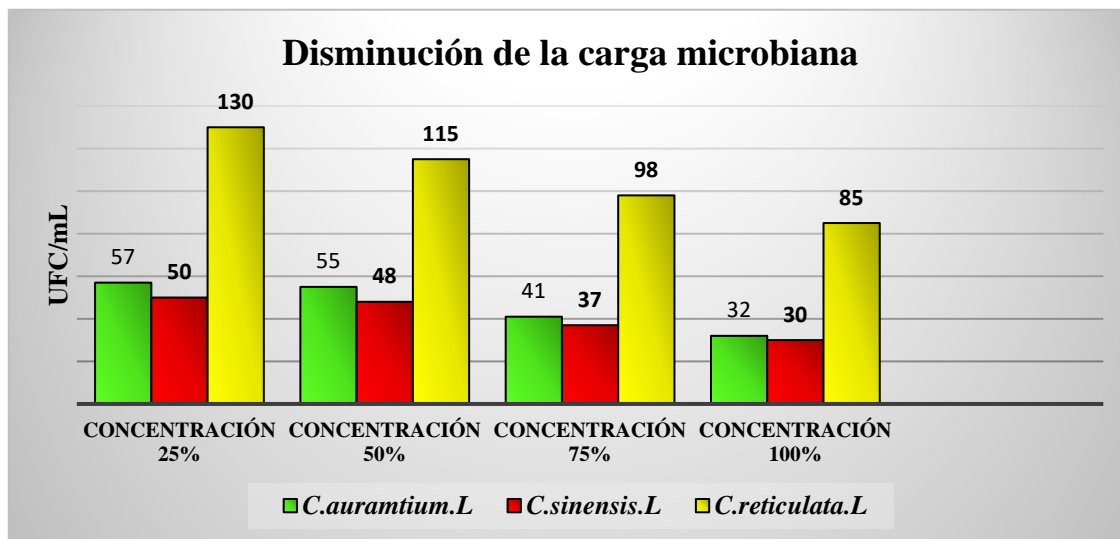


Gráfico N°7: Lavado de la muestra (guayabas) con aceite esenciales a distintas concentraciones.

A través de los datos mostrados en el gráfico N°7, de disminución de carga microbiana en muestra utilizando los aceites esenciales a concentración 100%, 75%, 50% y 25% para el lavado de la muestra disminuyen la carga microbiana, cabe recalcar que todas las

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

concentraciones presentan disminución siendo la variedad *C. aurantium*. L., y *C. sinensis*. L., quienes presentaron mejores resultados de aceites esenciales en estudio.

Las muestras adquiridas para el estudio, se trataron con los aceites esenciales a las distintas concentraciones, mientras las muestras que no recibieron tratamiento (muestra control negativo), al ser lavadas con agua destilada estéril disminuyen parte de su carga microbiana, pero resultaron en un conteo muy alto y se les considera “incontables”. Visualmente se encuentra una reducción de colonias en muestras tratadas con los aceites esenciales. **Anexos**

13

CAPÍTULO V:

Conclusiones

5.1. Conclusiones

Se extrajeron los aceites esenciales de las semillas de las variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, y *Citrus reticulata L.* Para la preparación se utilizó la misma cantidad de muestra y solvente, pero se obtuvo mejor rendimiento en el aceite esencial *Citrus. reticulata. L.*, en comparación a otras dos variedades en estudio, notándose que *Citrus. reticulata. L.*, produce mayor volumen, es decir un mayor rendimiento ya que se utilizó el mismo procedimiento se trabajó bajo las mismas condiciones.

Por el método de difusión en agar y método modificado de pozos agar, fue determinada la acción de los aceites esenciales. Teniendo mejores resultados para el aceite esencial *Citrus. reticulata. L.*, frente a la cepa *Escherichia coli* (ATCC) 25922 en las concentraciones de 100% y 75%, mostrando **Sensibilidad**. Para el análisis de la acción bactericida en *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923, bacteria más susceptible a los aceites esenciales a concentraciones de 100% y 75% mostro **Sensibilidad**, a concentraciones de 50% y 25% los aceites no presentaron actividad. Podemos observar que el máximo de efectividad inhibitoria se alcanza en la concentración 100%.

Mediante el lavado de las frutas y verduras con los aceites esenciales a las distintas concentraciones se observó una disminución de la carga microbiana, teniendo un mejor efecto los aceites esenciales las variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus. sinensis. L.*, tendrá menos efectos secundarios que uno químico.

Por tanto, con los resultados obtenidos de los objetivos dos y tres se acepta la **Hipótesis**.

5.2. Recomendaciones

Teniendo los resultados antes presentados, se pueden hacer las siguientes recomendaciones para futuros estudios investigativos:

A estudiantes:

Investigar la caracterización físico-química de los aceites esenciales para determinar si se obtuvo un aceite esencial concentrado libre de solvente, efectividad bactericida se deba no al principio activo sino aun exceso de solvente, vida útil, y componentes que le confieren propiedad bactericida.

En estudios futuros y similares, para realizar la recolección de muestras (semillas) de las variedades *Citrus* acudir a las diferentes empresas que utilizan como materia prima para la elaboración de sus productos las variedades en estudio con el motivo de reducir costos y tiempo, ya que al comprar no justifica la cantidad de semillas obtenidas.

Comparar la acción bactericida en otras bacterias de interés para la industria alimenticia.

Realizar un estudio complementario para evaluar la efectividad antimicótica de los aceites esenciales.

Para elaboración de un producto, establecer una formulación que permita agregar un componente para obtener mayor volumen del producto, sin disminuir la concentración de los aceites esenciales.

Comprobar la acción bactericida en una mezcla de los aceites esenciales en estudio, o con otros aceites esenciales.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Ancillo y Medina (s.f.). *Los Cítricos*. Jardín Botánico de la Universidad de Valencia. 7-79.
- Caldas Avila , A. P. (2012). “*Optimización, Escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido-liquido*”. Cuenca-Ecuador.
- Camacho, Giles, Ortegón, Palao, Serrano y Velázquez. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. *Versión para Administrador de Manuales y Documentos*
- Da Silva, A. P. (2015). Determinación de la actividad antibacteriana de tres variedades de limón . *Universidad, Ciencia y Sociedad*.
- Díaz, Barrio Pilar, Darré, López, Cofre, Condori...Alcalde (2014). Análisis Microbiológico de los Alimentos. Anmat. Volumen (3) p.17-18
- Duraffourd, C., Hervicourt, L., y Lapraz, J. C. (1987). *Cuaderno de Fitoterapia Clínica*. Barcelona : Masson.
- Ecured*. (01 de Julio de 2017). Obtenido de ecured: https://www.ecured.cu/Naranja_agria
- Ecured*. (01 de Julio de 2017). Obtenido de ecured: <http://tropicos.org/Home.aspx>
- Ecured*. (01 de Julio de 2017). Obtenido de ecured: <https://www.ecured.cu/Mandarina>
- elika (2013). Staphylococcus aureus. *Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria*. Recuperado de http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento95/7.Staphylococcus.pdf
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucío, P. (2010). *Metodología de la Investigación*. Mexico: mcgraw-Hill / Interamericana. Editores, S.A. de C.V. .
- Martínez, J., Sulbarán de Ferrer, B., Ojeda de Rodríguez, G., Ferrer, A., & Nava, R. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Revista de la Facultad de Agronomía*.
- Montoya Romero, M. I. (2012). Herramientas Indispensable en el Control de Calidad Interno en Microbiología. *Instituto Colombiano de Medicina Tropical*.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

(Ortuño Sánchez (2006). Manual Práctico de los Aceites Esenciales, aromas y Perfumes. AIYANA. P.7-21.

Organización Mundial de la Salud. (2007). *Manual sobre las Cinco claves para la inocuidad de los alimentos*. Francia: Ediciones de la OMS.

Picón Forondo, E. (Junio 2013). Capacidad antimicrobiana de subproductos cítricos de limón, naranja y mandarina frente a *Escherichia coli* 0157:h7 y *Salmonella typhimurium*. *Universidad Politecnica de Valencia*, 7-17.

Piura López, J. (2008). *Metodología de la investigación científica- Un enfoque integrador*. Managua: 6ta ed.- Managua: Xerox.

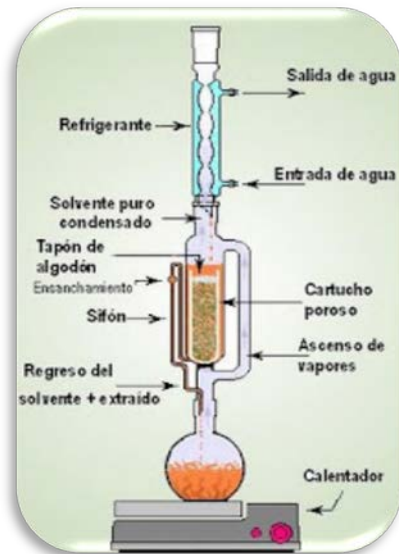
Procedimiento para determinar materia grasa. (1990). *Aoac*, 1 de 2.

Rodríguez Cavallini, E., Gamboa Coronado, M. M., Hernández Chavarría, F., & García Hidalgo, J. D. (s.f.). *Bacteriología General*. San José: Universidad de Costa Rica .

ANEXOS

Anexos 1

Ilustración N° 1: Etapas de extracción Soxhlet



<http://procesosbio.wikispaces.com>

Ecuación 1: Regla de tres para preparar diluciones

10 mL ————— 100%

Dilución de aceites esenciales

X ————— 75%

X= 7,5 mL de aceite esencial

10 mL ————— 100%

X ————— 50%

X= 5 mL de aceite esencial

10 mL ————— 100%

X ————— 25%

X= 2,5 mL de aceite esencial

Figura 6:

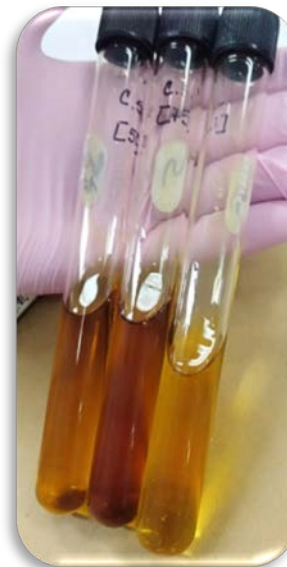



Ilustración N° 2: Método Kirby-Bauer

Explicación método de difusión en agar (Kirby-Bauer)



Preparación de las placas con el medio de cultivo
Se vierten 25 a 30 ml de agar Müeller Hinton fundido en placas estériles de 100 mm de diámetro, para obtener una altura de 4 mm. Para eliminar la humedad se colocan las placas de 15 a 30 min. en estufa de cultivo a 37°C.

Preparación del inóculo
Se toman 4 o 5 colonias bien aisladas y de igual morfología de la placa de cultivo de 18 a 24 horas de incubación, con un ansa y se introducen en 5 ml de caldo tripeína soja. Si la turbidez obtenida es la adecuada, no es necesario una incubación posterior, caso contrario, se incuba a 37°C hasta lograr la turbidez del testigo, la que termina de ajustarse agregando solución fisiológica si es necesario. El testigo a usar corresponde al 0,5 de la escala de Mc Farland.

Estándares de interpretación de zonas de diámetro.
Existen tablas específicas CLSI periódicamente publicadas que indican los criterios para interpretar los diámetros de zonas para categorizar exactamente los niveles de susceptibilidad de los microorganismos a diferentes agentes antimicrobianos.



Categorías Interpretativas.

Sensible Una infección debido a una cepa puede ser apropiadamente tratada con la dosis de agente antimicrobiano recomendado para ese tipo de infección y especie infectante.

Intermedio Implica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde la droga es fisiológicamente concentrada (por ej. quinolonas y β-lactámicos en orina) o cuando una dosis mayor que lo normal de una droga puede ser usada (por ej. β-lactámicos).

Resistente Las cepas resistentes no son inhibidas por la concentración sistémica usualmente alcanzable de un agente cuando los esquemas de dosificación normal son usados.

Lectura de Resultados

Fuente: <https://slideplayer.es/slide/4087041>

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

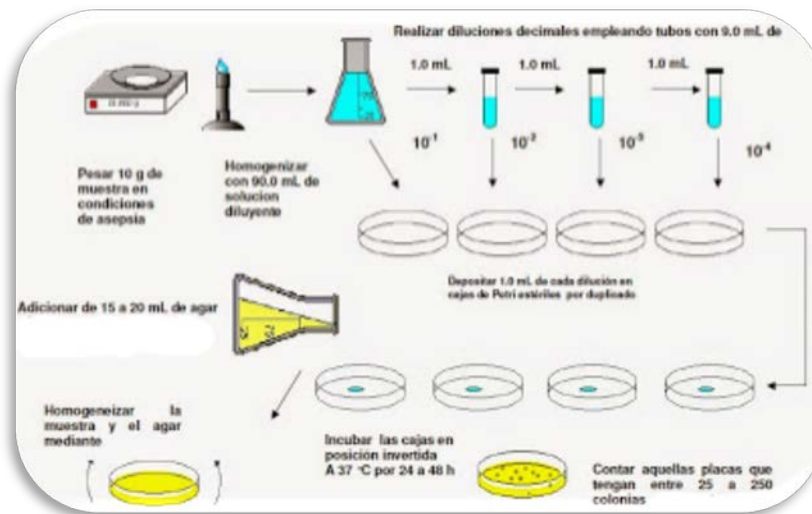
Anexos 3

Ilustración N° 3: Método de Pozos Agar



Fuente: www.alamy.es/imagenes/cutting-plug-agar-cork-borer.html

Ilustración N° 4: Método Técnicas Básicas Conteo en Placas



Fuente: blogspot.com/2015/05/metodo-de-medicion-conteo-con-placa.html

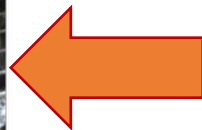
Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Anexos 4

Figura 7: Recolección de la muestra



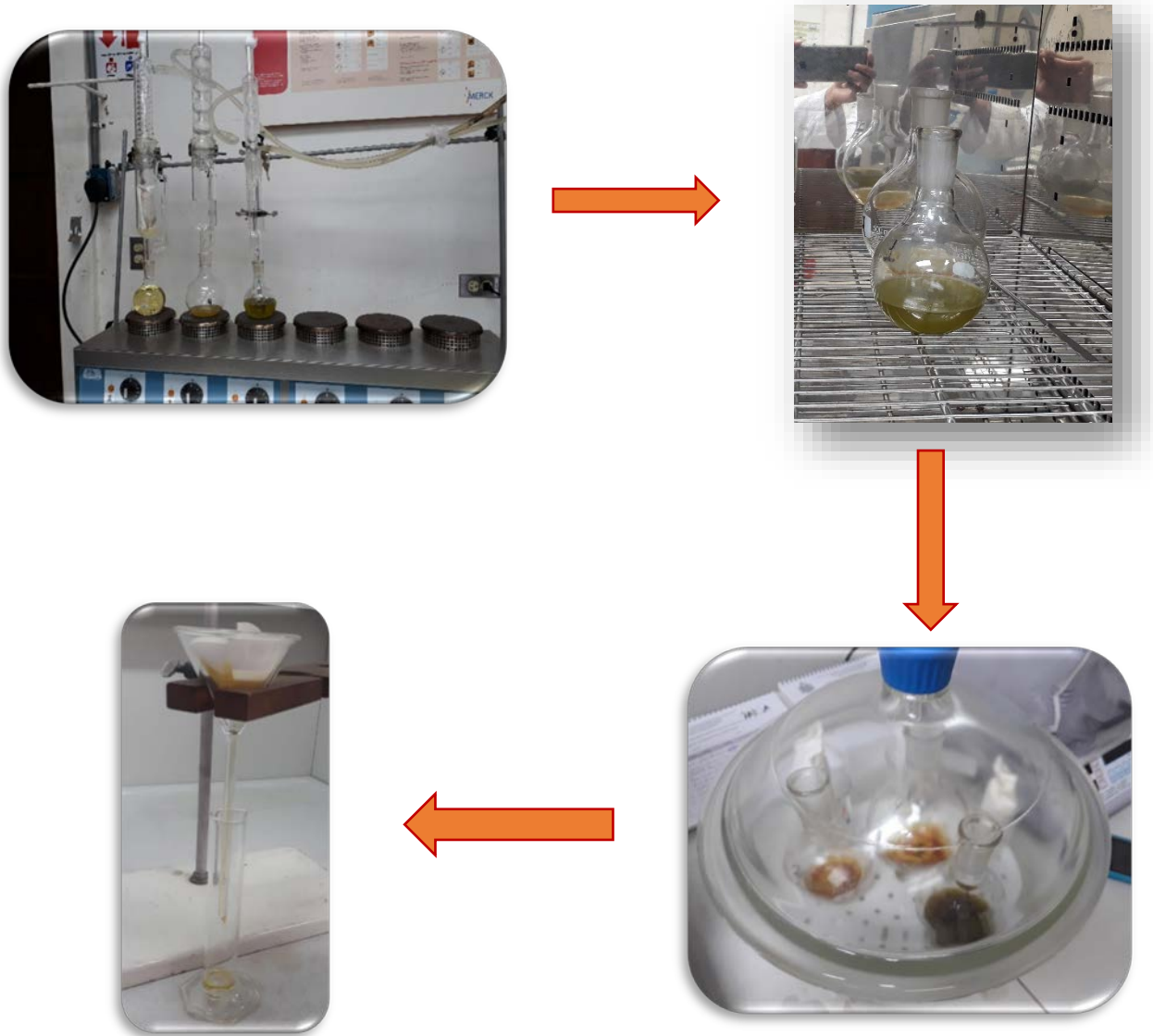
Figura 8: Secado en estufa y triturado de la muestra



Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Anexos 5

Figura 9: Extracción de aceites esenciales y eliminación de solvente



Bra. Abud Espinoza María Monseratt,
Bra. Gutiérrez Narváez Elieth Antonieta

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Anexos 6

Figura 10: Preparación de medios

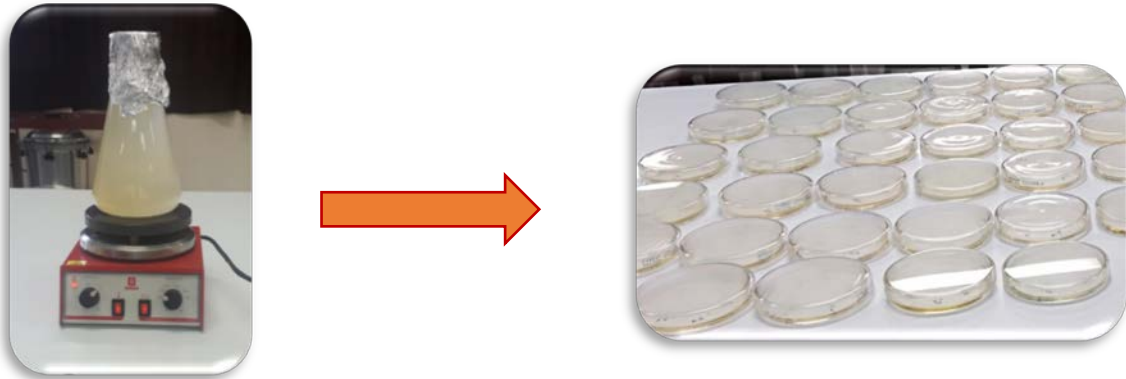
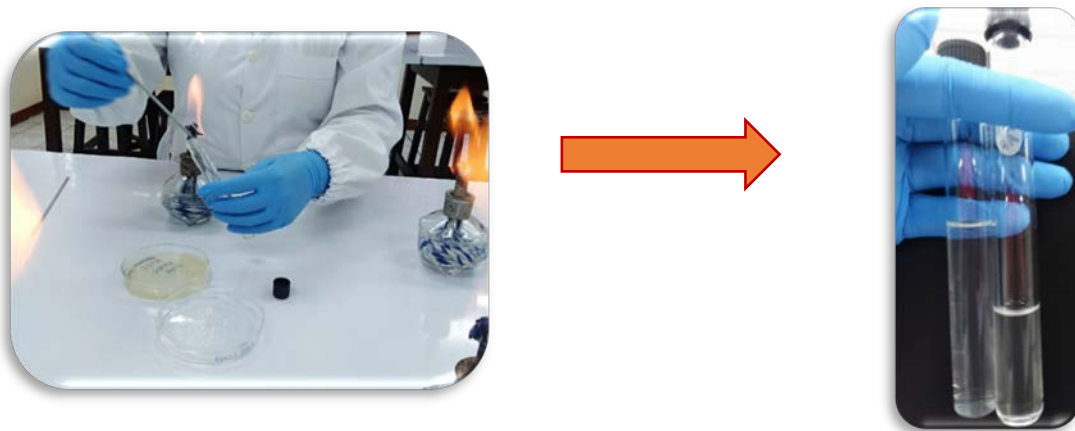


Figura 11: Preparación de inóculo y ajuste a escala Mc Farland



Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Anexos 7

Tabla 7: Extracción de los aceites esenciales mediante el método Soxhlet

Parámetros	<i>Citrus.aurantium.L</i>	<i>Citrus.sinensis.L.</i>	<i>Citrus. reticulata. L.</i>
Cantidad de muestra pesada en el dedal	25,00 g	25,00 g	25,00 g
Cantidad de Solvente 2 balones (250 mL), 1 balón (500 mL)	balón capacidad 250 mL Se añadió 275 mL	balón capacidad 250 mL Se añadió 275 mL	balón capacidad 500 mL Se añadió 475 mL
Solvente recuperado	200 mL	200 mL	420 mL
Cantidad total muestra utilizada	259,492 g	259,492 g	259,492 g
Cantidad de aceite esencial filtrado	54,0 mL	45,5 mL	65,8 mL
Porcentaje de Rendimiento	20,80%	17,53 %	25,35 %
Temperatura	78,0 °C		
Tiempo de extracción	7 horas		

Ecuación 2: Cálculos para determinar el Rendimiento de los aceites esenciales

Éste procedimiento se llevó acabo basándonos en el método gravimetría-volumétrico, (Ceballos, 2012).

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{volumen del aceite esencial (mL)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{54 \text{ mL}}{259,492 \text{ g}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 20,80 \%$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{45,5 \text{ mL}}{259,492 \text{ g}} \times 100$$

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

$$\% \text{ Rendimiento} = 17,53 \%$$

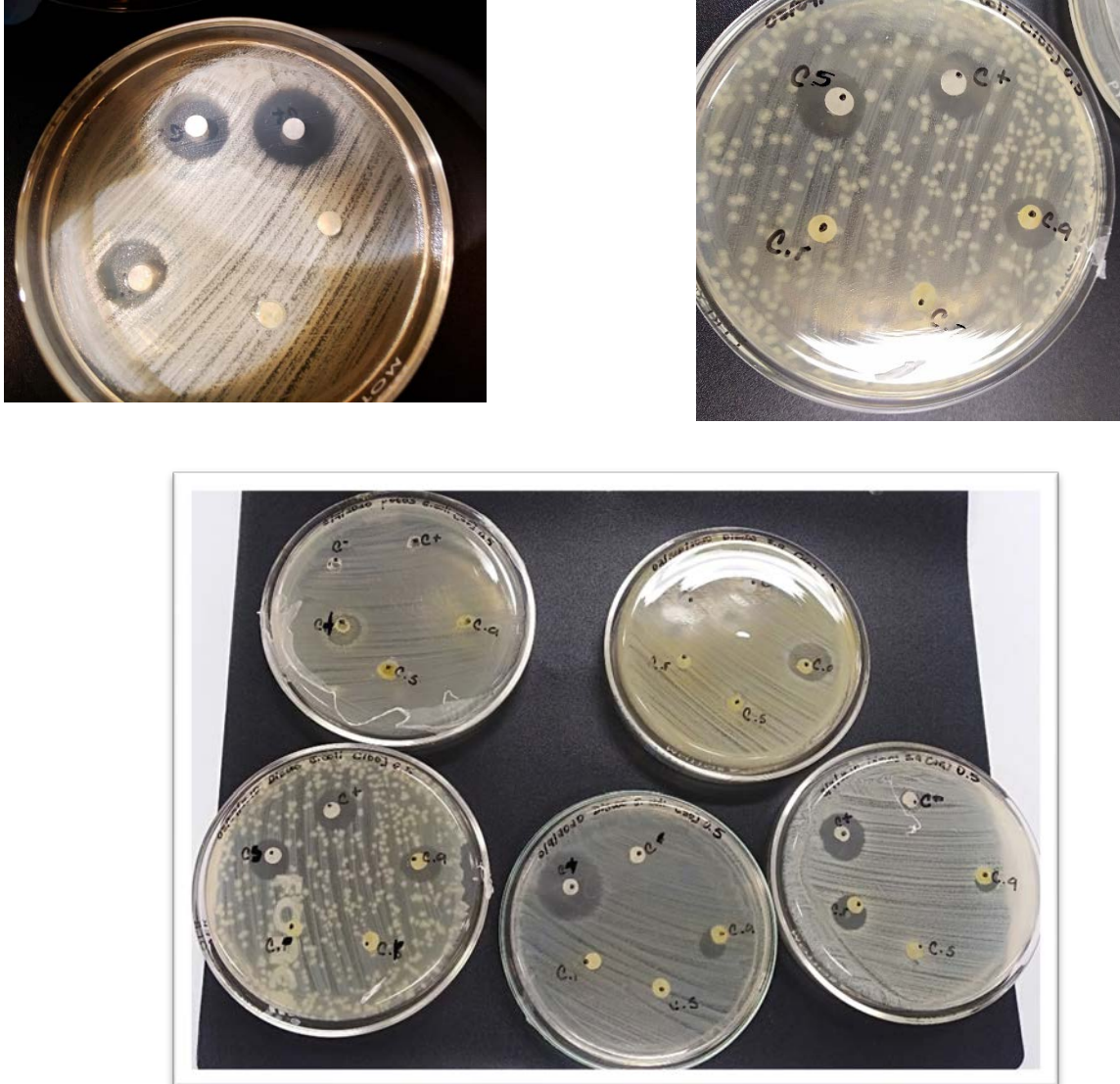
$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{65,8 \text{ mL}}{259,492 \text{ g}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 25,5 \%$$

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Anexos 8

Figura 12: Resultados Método Kirby-Bauer y pozos en agar



Bra. Abud Espinoza María Monseratt,
Bra. Gutiérrez Narváez Elieth Antonieta

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Anexos 9

Tabla 8: Datos de gráficos acción bactericida en la cepa *Escherichia coli* (ATCC)25922

Comparación de la acción bactericida de los aceites esenciales en la cepa <i>Escherichia coli</i> (ATCC)25922									
Concentración 100%	Halos de inhibición (mm)	Inhibición Escala Duraffourd	Concentración 75%	Halos de inhibición (mm)	Inhibición Escala Duraffourd	Concentración 50%	Inhibición Escala Duraffourd	Concentración 25%	Inhibición Escala Duraffourd
<i>C.a.L.</i>	13	S	<i>C.a.L.</i>	11	S	<i>C.a.L.</i>	N	<i>C.a.L.</i>	N
<i>C.s.L.</i>	12	S	<i>C.s.L.</i>	10	S	<i>C.s.L.</i>	N	<i>C.s.L.</i>	N
<i>C.r.L.</i>	15	MS	<i>C.r.L.</i>	13	S	<i>C.r.L.</i>	N	<i>C.r.L.</i>	N

Nota: Sensible (S), Muy Sensible (MS), Nula (N)

Tabla 9: Datos de gráficos acción bactericida en la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC)25923

Comparación de la acción bactericida de los aceites esenciales en la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC)25923									
Concentración 100%	Halos de inhibición (mm)	Inhibición Escala Duraffourd	Concentración 75%	Halos de inhibición (mm)	Inhibición Escala Duraffourd	Concentración 75%	Inhibición Escala Duraffourd	Concentración 25%	Inhibición Escala Duraffourd
<i>C.a.L.</i>	16	MS	<i>C.a.L.</i>	14	MS	<i>C.a.L.</i>	N	<i>C.a.L.</i>	N
<i>C.s.L.</i>	15	S	<i>C.s.L.</i>	13	S	<i>C.s.L.</i>	N	<i>C.s.L.</i>	N
<i>C.r.L.</i>	17	MS	<i>C.r.L.</i>	15	MS	<i>C.r.L.</i>	N	<i>C.r.L.</i>	N

Bra. Abud Espinoza María Monseratt,
Bra. Gutiérrez Narváez Elieth Antonieta

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Anexos 10

Tabla 10: Datos de gráficos acción bactericida método modificado de Pozos Agar en la cepa *Escherichia coli* (ATCC)25922

Comparación de la acción bactericida de los aceites esenciales en la cepa <i>Escherichia coli</i> (ATCC)25922									
Concentración 100%	Halos de inhibición (mm)	Inhibición Escala Duraffourd	Concentración 75%	Halos de inhibición (mm)	Inhibición Escala Duraffourd	Concentración 50%	Inhibición Escala Duraffourd	Concentración 25%	Inhibición Escala Duraffourd
<i>C.a.L.</i>	13	S	<i>C.a.L.</i>	10	S	<i>C.a.L.</i>	N	<i>C.a.L.</i>	N
<i>C.s.L.</i>	12	S	<i>C.s.L.</i>	10	S	<i>C.s.L.</i>	N	<i>C.s.L.</i>	N
<i>C.r.L.</i>	14	S	<i>C.r.L.</i>	12	S	<i>C.r.L.</i>	N	<i>C.r.L.</i>	N

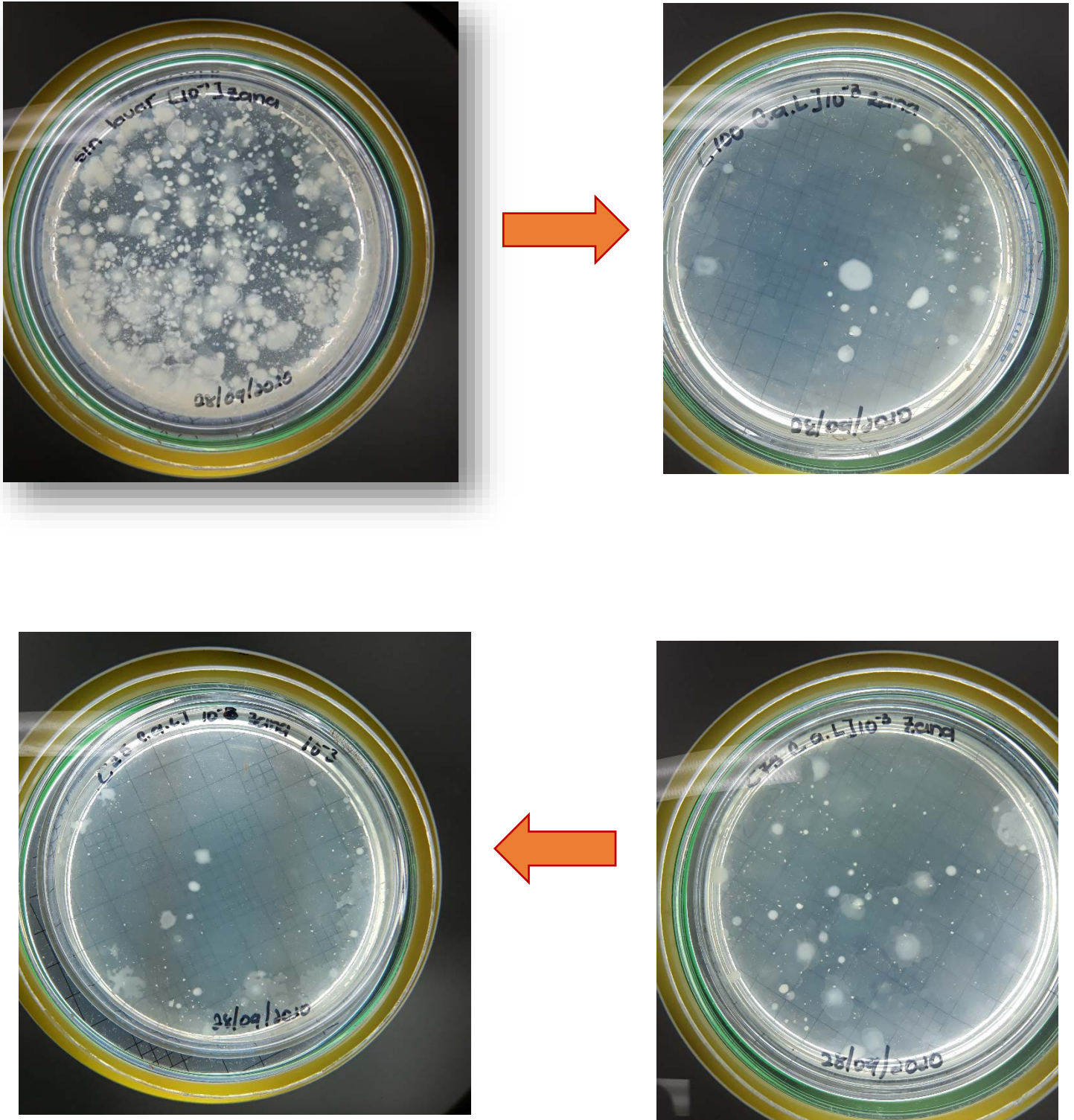
Tabla 11: Datos de gráficos acción bactericida metodo modificado en pozos agar en la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC)25923

Comparación de la acción bactericida de los aceites esenciales en la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC)25923									
Concentración 100%	Halos de inhibición (mm)	Inhibición Escala Duraffourd	Concentración 75%	Halos de inhibición (mm)	Inhibición Escala Duraffourd	Concentración 75%	Inhibición Escala Duraffourd	Concentración 25%	Inhibición Escala Duraffourd
<i>C.a.L.</i>	15	S	<i>C.a.L.</i>	12	MS	<i>C.a.L.</i>	N	<i>C.a.L.</i>	N
<i>C.s.L.</i>	14	S	<i>C.s.L.</i>	13	S	<i>C.s.L.</i>	N	<i>C.s.L.</i>	N
<i>C.r.L.</i>	16	MS	<i>C.r.L.</i>	14	MS	<i>C.r.L.</i>	N	<i>C.r.L.</i>	N

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Anexos 11

Figura 13: Resultados de la disminución de la carga microbiana



Bra. Abud Espinoza María Monseratt,
Bra. Gutiérrez Narváez Elieth Antonieta

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Anexos 12

Tabla 9: Datos de gráficos disminución de la carga microbiana en lavado de verduras (zanahorias)

Comparación de la disminución de carga microbiana en lavado de Verdura											
Concentración 100%	Dilución 10^{-3}	UFC/mL :37°/18h	Concentraci ón 75%	Dilución 10^{-3}	UFC/mL: 37°/18h	Concentración 50%	Dilución 10^{-3}	UFC/mL:37° /18h	Concentración 25%	Diluciones 10^{-3}	UFC/mL:37 °/18h
<i>C.a.L.</i>	51	$55 \cdot 10^3$	<i>C.a.L.</i>	50	$54 \cdot 10^3$	<i>C.a.L.</i>	78	$57 \cdot 10^3$	<i>C.a.L.</i>	88	$89 \cdot 10^3$
	48			58			35			90	
<i>C.s.L.</i>	38	$25 \cdot 10^3$	<i>C.s.L.</i>	47	$36 \cdot 10^3$	<i>C.s.L.</i>	21	$45 \cdot 10^3$	<i>C.s.L.</i>	64	$62 \cdot 10^3$
	12			25			68			59	
<i>C.r.L.</i>	87	$85 \cdot 10^3$	<i>C.r.L.</i>	85	$72 \cdot 10^3$	<i>C.r.L.</i>	140	$131 \cdot 10^3$	<i>C.r.L.</i>	171	$151 \cdot 10^3$
	83			58			122			131	

Bra. Abud Espinoza María Monseratt,
Bra. Gutiérrez Narváez Elieth Antonieta

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, *Citrus reticulata L.* para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Anexos 13

Tabla 10: Datos de gráficos disminución de la carga microbiana en lavado de frutas (guayabas)

Comparación de la Disminución de la carga microbiana de Fruta											
Concentración 100%	Diluciones 10^{-3}	UFC/mL: 37°/18h	Concentración 75%	Diluciones 10^{-3}	UFC/mL: 37°/18h	Concentración 50%	Diluciones 10^{-3}	UFC/mL:37°/ 18h	Concentración 25%	Diluciones 10^{-3}	UFC/mL:3 7°/18h
<i>C.a.L.</i>	80	$55*10^3$	<i>C.a.L.</i>	70	$57*10^3$	<i>C.a.L.</i>	50	$41*10^3$	<i>C.a.xL.</i>	30	$32*10^3$
	30			43			32			33	
<i>C.s.L.</i>	46	$50*10^3$	<i>C.s.L.</i>	25	$37*10^3$	<i>C.s.L.</i>	36	$30*10^3$	<i>C.s.L.</i>	50	$48*10^3$
	53			48			30			45	
<i>C.r.L.</i>	88	$85*10^3$	<i>C.r.L.</i>	100	$98*10^3$	<i>C.r.L.</i>	120	$115*10^3$	<i>C.r.L.</i>	134	$130*10^3$
	82			95			110			125	

Bra. Abud Espinoza María Monseratt,
Bra. Gutiérrez Narváez Elieth Antonieta

GLOSARIO

Aceite esencial: los aceites esenciales como mezclas complejas de hidrocarburos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonilos, aldehídos aromáticos y fenoles que se encuentran en hojas, cáscaras o semillas de algunas plantas.

Agar: Sustancia gelatinosa que se obtiene a partir de ciertas algas.

Bactericida: Este tipo de antibiótico que no sólo inhibe el crecimiento, sino que es letal para las bacterias. Ellos provocan la muerte del microorganismo de manera reversible ocasionando su muerte.

Cepa referencia: Material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes.

Dilución: Sustancia que resulta de diluir una cosa en un líquido.

Escala McFarland: Es un estándar de turbidez, el cual es de gran utilidad para tener una idea aproximada de la población bacteriana en una muestra. Preparación del estándar 0,5 de McFarland: añadir 0,05 mL de BaCl₂ 0,048 M (1,75% [p/v] de BaCl₂ 2H₂O) a 9,95 mL de H₂SO₄ 0,36 N (1% v/v).

Esterilización: Proceso por el cual se obtiene un producto libre de microorganismos viables.

Halo de Inhibición: Es el diámetro de la zona de inhibición que debe medirse alrededor del disco, que se utiliza para determinar la sensibilidad del microorganismo al antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición, expresada en milímetros, debe interpretarse como sensible, intermedia o resistente según las categorías establecidas por los organismos oficiales.

Hidrofóbico: En el contexto fisicoquímico, el término se aplica a aquellas sustancias que son repelidas por el agua o que no se pueden mezclar con ella. Un ejemplo de sustancias hidrófobas son los aceites.

Incubar: Mantener a una temperatura de calor constante.

Comprobación de acción bactericida del aceite esencial de semillas de tres variedades *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* L. para el lavado de frutas y verduras. UNAN-MANAGUA 2018 - 2020.

Inóculo: Suspensión de microorganismos que se transfieren a un ser vivo o a un medio de cultivo a través de la inoculación.

Plato Petri: Es un recipiente redondo, de cristal o plástico, con una cubierta de la misma forma que la placa, pero algo más grande de diámetro, para que se pueda colocar encima y cerrar el recipiente, aunque no de forma hermética. Se utiliza en los laboratorios principalmente para el cultivo de bacterias, mohos y otros microorganismos.

Polisorbato tween 80: Proporciona estabilidad a las mezclas de líquidos inmiscibles entre sí, evitando la sinéresis o separación de fases.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.