



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE
EXTRACTOS CÍTRICOS”**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTA:

MARISOL TRUJILLO MADRIGAL

ASESOR

DRA. MA. DEL CARMEN CHÁVEZ PARGA

ASESOR EXTERNO

DR. JUAN CARLOS GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Morelia, Michoacán, Noviembre del 2012



Ecológicos Internacionales de México S.A.C.V.,

La información presentada, es autorizada por el Ing. Ignacio Maldonado González, representante legal de la empresa Ecológicos Internacionales de México S.A. de C.V., propietaria de los derechos del trabajo de investigación “Análisis y caracterización de extractos cítricos”.

AGRADECIMIENTOS

Empresa Ecológicos Internacionales de México S.A.C.V., por permitirme llevar a cabo el desarrollo de este proyecto de investigación, en especial al Ing. Ignacio Maldonado.

Coordinación de la Investigación Científica UMSNH por la beca otorgada.

A mi asesora de tesis, Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga, por dirigir esta tesis, por confiar en mí desde el inicio. Agradezco su alto empeño, dedicación, aportaciones técnicas, experiencias, consejos, sin su dedicación y disponibilidad, sin duda no hubiera podido lograr esta meta.

A mi asesor de tesis, Dr. Juan Carlos González Hernández, agradezco todo su apoyo, su paciencia y los conocimientos adquiridos para la realización de esta tesis. Las facilidades brindadas del laboratorio de Ingeniería Bioquímica perteneciente al Instituto Tecnológico de Morelia, a cargo del Dr. Juan Carlos.

A mi mesa de jurado: Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga, Dra. Graciela Eréndira Núñez Palenius, M.D.H. Betzaida López Gutiérrez, por su amable aceptación, el tiempo y por medio de sus observaciones contribuir con mi crecimiento profesional.

A mis maestros que fueron parte de mi formación como estudiante en estos años, por los conocimientos que me enseñaron, los cuales me permiten hoy realizarme como profesionista.

A todas las personas que hicieron posible este proyecto, muchas gracias por su apoyo y enseñanza.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos. A todos, muchas gracias.

Como un testimonio de mi eterno amor a Dios y a mi familia.

A mis padres:

Gracias por su existencia, por los valores que me han inculcado y el amor con que me han cuidado siempre. Por lo que soy y por todo el tiempo que han pensado en mí...

A ti mamá, por tu amor incondicional, que con firmeza y ternura me has cuidado, quien todo lo hace siempre por lo mucho que me quiere. Gracias por enseñarme a tener fe en Dios y en mí misma: por mostrarme con tu gran ejemplo que hay que amar lo que se hace cada día.

TE AMO MAMI.

A ti papá, por enseñarme el valor del esfuerzo y que hay que trabajar muy duro para lograr lo que se quiere.

TE AMO PAPI.

A mis hermanos que con la confianza que pusieron en mí, hicieron esto posible, aún con la forma tan peculiar de expresar y demostrarme su amor. Gracias porque creyeron en mí y me dieron fuerzas para llegar aquí.

Los amo César y Cristian.

Gracias a ti Dios, por haberme protegido siempre, por permitirme la oportunidad de llegar a ser Ing. Químico y el privilegio de conocer a tantas personas tan maravillosas, de las que aprendí tanto y por estar hoy rodeada de quienes más amo.

Marisol Trujillo Madrigal

“ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS CÍTRICOS”

Presenta: Marisol Trujillo Madrigal

Dirigida por: Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga y Dr. Juan Carlos, González Hernández

RESUMEN

El uso de diferentes técnicas analíticas empleadas como la cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de absorción en el infrarrojo permitió clasificar algunos de los principales componentes de los cítricos en estudio, como el ácido cítrico, ácido ascórbico, donde se observa que existe una razón inversa entre ambos, es decir, que según los resultados obtenidos, las frutas más ácidas son las que tienen menor cantidad de vitamina C.

En el presente trabajo se estudió la actividad antibacteriana de las diferentes partes del cítrico (cáscara, semilla y fruto completo) mediante extracción por prensado. Las bacterias y levaduras que se utilizaron para determinar la actividad antibacteriana fueron: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichias pastoris*, *Candida utilis*. La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar (disco-placa). El cítrico 1 y 2 en fruto completo presentaron mayor actividad antibacteriana.

Se muestran las principales características estructurales de algunos componentes y sus métodos de separación e identificación. Estos compuestos presentan diferentes funciones en las plantas, como atrayentes de animales o como agentes protectores; además, algunos componentes presentan actividad antioxidante, lo cual está relacionado con la salud humana.

INDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	v
RELACIÓN DE FIGURAS	ix
RELACIÓN DE TABLAS	xii
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	1
Capítulo 2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Agentes antimicrobianos.	2
2.1.1. Antibióticos.	2
2.1.2. Tipos de antimicrobianos:	2
2.1.3. Clasificación de los agentes antimicrobianos de uso sistémico.	2
2.1.4. Características de los antimicrobianos de uso sistémico.....	3
2.2. Generalidades de los cítricos.	4
2.2.1. Origen de los cítricos.	4
2.2.2. Propiedades de los cítricos.	5
2.2.3. Especies principales de cítricos.	6
2.3. Aceites esenciales.....	6
2.3.1. Técnicas de Extracción de Aceites Esenciales.	7
Capítulo 3. JUSTIFICACIÓN	9
3.1. OBJETIVOS	10
3.1.1. Objetivo general.	10
3.1.2. Objetivos específicos.....	10
3.2. HIPÓTESIS	10
Capítulo 4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1. Preparación de las muestras.	11

4.2. Extracción por prensado.....	12
4.3. Determinación de pH.....	12
4.4. Determinación de Ácido Ascórbico por Método de Titulación.	13
4.4.1. Definición y Principio del Método.	13
4.4.2. Procedimiento.....	13
4.5. Kit Enzimático para la Identificación de Ácido Cítrico Megazyme®.....	14
4.5.1. Fundamento.....	14
4.5.2. KIT y Preparación de Reactivos.....	15
4.5.3. Procedimiento.....	16
4.6. Acidez total.....	18
4.6.1. Definición y Principio del Método.	18
4.6.2. Metodología.	18
4.7. Determinación del Halo de Inhibición en Antibiogramas.	22
4.8. Análisis de Ácido Cítrico y Ácido Ascórbico por HPLC.	24
4.9. Espectrometría de absorción en el infrarrojo.	26
4.10. Cromatografía de gases.	27
Capítulo 5. RESULTADOS.....	28
5.1. Resultados pH mediante potenciómetro.	28
5.2. Ácido Ascórbico.....	30
5.3. Identificación de Ácido Cítrico mediante kit Megazyme®.....	31
5.4. Acidez total por titulación.....	33
5.5. Actividad antimicrobiana de los extractos.	34
5.6. Ácido Cítrico y Ácido Ascórbico HPLC.....	40
5.7. Espectros de absorción en el espectrómetro de infrarrojo.	45
5.8. Cromatogramas.....	49



CONCLUSIONES.....	60
RECOMENDACIONES.	61
VALIDACIÓN DE LA HIPOTESIS Y CUMPLIMIENTO OBJETIVOS.	62
REFERENCIAS.....	63

RELACIÓN DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Preparación de las muestras (Fuente: Trujillo, 2012).	11
Figura 2. Potenciómetro marca HANNA 20V (Fuente: Trujillo, 2012).	12
Figura 3. Kit Enzimático Ácido Cítrico Megazyme® (García y col., 2011).	15
Figura 4. Espectrómetro FT-IR marca Perkin-Elmer. (Trujillo, 2012).	26
Figura 5. Cromatógrafo de gases marca Varian 3800. (Trujillo, 2012)	27
Figura 6. Halos de inhibición de discos con extractos de fruto completo, cítrico 1 y cítrico 2. (Trujillo, 2012)	36
Figura 7. Halo de inhibición de discos con extractos de semilla de cítrico 4. (Trujillo, 2012).	37
Figura 8. Halo de inhibición de discos con extractos de fruto completo, cítrico 1 y cítrico 2 en levaduras. (Trujillo, 2012).	38
Figura 9. Halo de inhibición de discos con extracto de semilla cítrico 3. (Trujillo, 2012)...	39
Figura 10. Halos de inhibición de discos con extractos de cáscara de los diferentes cítricos. (Trujillo, 2012).	39
Figura 11. Identificación de compuestos antimicrobianos en extractos de fruto completo, cítrico 1 y 2.	46
Figura 12. Identificación de compuestos antimicrobianos en extractos de fruto completo, cítrico 3 y 4.	47
Figura 13. Identificación de compuestos antimicrobianos en extractos de cáscara, Cítrico 1 y 2.	48
Figura 14. Identificación de compuestos antimicrobianos en extractos de cáscara, Cítrico 3 y 4.	48
Figura 15. Identificación de compuestos antimicrobianos en extractos de semilla, Cítrico 1,3 y 4.	49
Figura 16. Cromatograma de estándares inyectados.	50

Figura 17. Cromatograma 1-Dodeceno.....	51
Figura 18. Cromatograma 1-Pentadecanol.	51
Figura 19. Cromatograma Octadecano.	52
Figura 20. Cromatograma Cítrico 1, Fruto completo: octadecano, fenol, d-limoneno, 1-Dodeceno	52
Figura 21. Cromatograma Cítrico 2, Fruto Completo: etanol y fenol.....	53
Figura 22. Cromatograma Cítrico 3, Fruto completo: etanol y fenol.	53
Figura 23. Cromatograma Cítrico 4, Fruto completo: etanol, d-limoneno, fenol.....	54
Figura 24. Cromatograma Cítrico 1, Cáscara: etanol.	54
Figura 25. Cromatograma Cítrico 2, Cáscara: etanol y fenol.....	55
Figura 26. Cromatograma Cítrico 3, Cáscara: etanol y fenol.....	55
Figura 27. Cromatograma Cítrico 1, Semilla: etanol.....	56
Figura 28. Cromatograma Cítrico 3, Semilla: etanol, d-limoneno, fenol.....	56
Figura 29. Cromatograma Cítrico 4, Semilla: etanol y fenol.	57

RELACIÓN DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Determinación de pH.....	29
Gráfico 2. Ácido Ascórbico.....	31
Gráfico 3. Ácido Cítrico.....	32
Gráfico 4. Acidez Total.....	34
Gráfico 5. Diámetros de halos de inhibición para extractos de fruto completo en bacterias.	35
Gráfico 6. Diámetros de halos de inhibición para extractos de semillas en bacterias.....	36
Gráfico 7. Diámetros de halos de inhibición para extractos de fruto completo en levaduras.	37
Gráfico 8. Diámetros de halos de inhibición para extractos de semillas en levaduras.....	38
Gráfico 9. Curva de calibración Ácido Ascórbico a bajas concentraciones.....	40
Gráfico 10. Curva de calibración Ácido Ascórbico a altas concentraciones.....	41
Gráfico 11. Curva de calibración Ácido Cítrico a bajas concentraciones.....	42
Gráfico 12. Curva calibración Ácido Cítrico a altas concentraciones.....	42

RELACIÓN DE TABLAS.

	Página
Tabla 1. Procedimiento Kit Ácido Cítrico Megazyme®	16
Tabla 2. Comparación de Halos de Sensibilidad en mm (NCCLS).....	23
Tabla 3. Principales aplicaciones de la espectrometría en el infrarrojo. (Skoog, 2008)	26
Tabla 4. Valores de pH para cada uno de los extractos analizados.	29
Tabla 5. Ácido Ascórbico por método de titulación.....	30
Tabla 6. Kit Enzimático Ácido Cítrico Megazyme®.	32
Tabla 7. Acidez Total.	33
Tabla 8. Actividad antimicrobiana in vitro para bacterias, para los diferentes extractos. ..	34
Tabla 9. Actividad antimicrobiana in vitro para levaduras, para los diferentes extractos. .	35
Tabla 10. Curva de calibración Ácido Ascórbico.	40
Tabla 11. Curva de calibración Ácido Cítrico.	41
Tabla 12. Tiempo de retención y área de Ácido Ascórbico y Ácido Cítrico de los extractos por HPLC.....	43
Tabla 13. Análisis de Ácido Cítrico en extractos por HPLC.	44
Tabla 14. Análisis de Ácido Ascórbico en extractos por HPLC.....	44
Tabla 15. Tabla abreviada de las frecuencias de grupo de grupos orgánicos. (Skoog, 2008)	45
Tabla 16. Estándares inyectados Cromatografía de gases.	50

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.

Los cítricos son un conjunto de especies que pertenecen al género citrus, entre ellas se encuentran el limón, la naranja, la toronja y la mandarina. Desempeñan un papel destacado en la alimentación de muchas personas en el mundo entero. Una característica del género, es la presencia en todos los órganos de la planta de un aceite esencial que son productos obtenidos del reino vegetal, en los que se hallan concentrados sabores y aromas característicos. Están constituidos por mezclas complejas de hidrocarburos, compuestos oxigenados y residuos volátiles. Los aceites esenciales están contenidos en glándulas o vesículas secretoras inmersas en los tejidos de las hojas, flores, corteza (pericarpio) y semillas de los frutos de muchas especies.

Las plantas pueden producir aceite esencial para muchos y diversos fines; por un lado protegen a la planta de plagas, enfermedades e inclusive de la invasión de otras plantas, para atraer insectos y aves (polinizantes). Estas cualidades de protección y atracción, se ven reflejadas en propiedades antisépticas, antiinflamatorias, antidepresivas, afrodisiacas, entre otras, presentes en mayor o menor grado en la totalidad de los aceites.

El hombre desde la antigüedad ha usado sustancias naturales extraídas de las plantas, como los aceites esenciales, para combatir enfermedades y preservar alimentos. Es general aceptado que concentraciones pequeñas tengan el efecto de disminuir el crecimiento microbiano y pueden ser suficiente para obtener un producto seguro donde la cuenta inicial de microorganismos sea baja.

En el presente trabajo se hace un estudio sobre las diferentes partes del cítrico (fruto completo, cáscara y semilla), presentes en los extractos de cuatro variedades de cítricos, cultivados en el Estado de Michoacán, mediante la extracción por prensado, para obtener los agentes antimicrobianos y bactericidas para comprobar la acción de estos mediante diferentes técnicas microbiológicas.

En este proyecto de investigación experimental se describen los ensayos a realizar para la extracción, detección, aislamiento, caracterización y comprobación del funcionamiento de los extractos como microbicidas o fungicidas.

Capítulo 2. MARCO TEÓRICO.

2.1. Agentes antimicrobianos.

Sustancias químicas sintetizadas parcial o totalmente en laboratorio que son capaces de inhibir el crecimiento y/o destruir microorganismos. (“Generalidades antimicrobianos”, 2012).

2.1.1. Antibióticos.

Sustancias químicas sintetizadas por microorganismos que poseen acción antimicrobiana. (“Generalidades antimicrobianos”, 2012).

2.1.2. Tipos de antimicrobianos:

- **Desinfectantes:** sólo se aplican a sistemas inanimados y eliminan la carga microbiana total.
- **Sanitizantes:** sólo se aplican a sistemas inanimados y disminuyen la carga microbiana total.
- **Antisépticos:** reducen y controlan la presencia de microorganismos potencialmente patógenos, sólo se pueden aplicar externamente en seres vivos (piel y/o mucosas).
- **Antimicrobianos de uso sistémico:** reducen y controlan la presencia de microorganismos que han invadido los tejidos. Actúan en el organismo, pudiendo ser ingeridos (vía oral), absorbidos por piel (apósitos) y/o inyectados. (“Generalidades antimicrobianos”, 2012).

2.1.3. Clasificación de los agentes antimicrobianos de uso sistémico.

1. Origen:

- **Naturales:** se obtienen a partir de microorganismos (hongos, Bacterias, etc.).

- **Sintéticos:** se obtienen totalmente por síntesis química.
- **Semisintéticos:** se obtienen por modificaciones químicas de antimicrobianos naturales, con el fin de mejorarlos.

2. Efecto:

- **Bacteriostático:** la máxima concentración no tóxica que se alcanza en suero y tejidos impide el desarrollo y multiplicación de los microorganismos, sin destruirlos, pudiendo estos multiplicarse nuevamente al desaparecer el agente antimicrobiano. Sirven para complementar los mecanismos defensivos del huésped.
- **Bactericida:** su acción es letal sobre los microorganismos, por lo que éstos pierden irreversiblemente su viabilidad o son lisados.

3. Espectro de actividad:

- **Amplio:** actúan sobre un gran número de especies microbianas (ej. TETRACICLINA).
- **Intermedio:** actúan sobre un número limitado de microorganismos (ej. MACROLIDOS).
- **Reducido:** actúan sobre un pequeño número de especies microbianas (ej. POLIMIXINA).

4. Mecanismo de acción:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- Alteración de la permeabilidad celular.
- Inhibición de la síntesis proteica.
- Inhibición de la síntesis de DNA y RNA. (“Generalidades antimicrobianos”, 2012).

2.1.4. Características de los antimicrobianos de uso sistémico.

- Deben ser más bactericidas que bacterioestáticos.
- Deben mantenerse activos en presencia de plasma y líquidos corporales.
- Es deseable que sean efectivos frente a un amplio espectro de microorganismos.
- Los microorganismos susceptibles no se deben volver resistentes genética o fenotípicamente.

- No deben ser tóxicos y los efectos colaterales adversos tienen que ser mínimos para el huésped.
- La concentración activa frente a los microorganismos se debe alcanzar con rapidez y debe mantenerse durante un tiempo prolongado.
- Deben ser hidro y liposolubles. (“Generalidades antimicrobianos”, 2012).

2.2. Generalidades de los cítricos.

Los cítricos son un conjunto de especies, que pertenecen al género citrus. Desempeñan un papel destacado en la alimentación de muchas personas en el mundo entero. Una característica del género es la presencia, en todos los órganos de la planta de un aceite esencial que le da su olor característico. Las especies que engloba este grupo proporcionan notables cantidades de vitamina C, minerales (calcio y fósforo). (Albrigo y Devices, 1999).

Los cítricos pertenecen a la clase Angiospermae, a la subclase dicotiledónea, a la orden rutae, a la familia rutaceae y al género citrus y cuenta con más de 145 especies, entre las que se destacan: naranja (citrus sinensis), mandarina (citrus reticulata), limón (citrus limón), lima (citrus aurantifolia), toronja (citrus paradisi). Se cree que el área general de origen de los cítricos es el suroeste de Asia incluyendo desde Arabia Oriental hacia el este hasta Filipinas y desde el Himalaya hacia el sur hasta Indonesia o Australia, el movimiento de dispersión de los diferentes tipos de cítricos ocurrió dentro del área general de origen desde antes de que existiera registro histórico (Albrigo y Devices, 1999).

2.2.1. Origen de los cítricos.

El origen de los cítricos se centra en las regiones subtropicales y tropicales de Asia, paulatinamente, se ha ido introduciendo en todas las regiones del mundo que presenten un clima cálido. Los principales países productores del mundo son La China, España, Sudáfrica, Australia y Estados Unidos (California, Texas y Florida).

Resulta muy difícil precisar cuántas especies originales hay dentro de este género porque en la mayoría de las ocasiones muchas de ellas son el resultado de numerosos cruces entre especies híbridas que se llevan a cabo durante las primeras fases de cultivo en la India y en

China. Muchos expertos consideran que existen sólo cuatro especies originales (lima, pomelo, cidra y mandarina) y que el resto son todas especies híbridas. (“Los cítricos”, 2012).

El cultivo de limón en Michoacán se atribuye a la llegada de inmigrantes italianos, quienes en 1885 se trasladaron hasta Apatzingán, Michoacán, donde compraron tierras y organizaron las colonias agrícolas de Lombardía y Nueva Italia.

Introdujeron varios cultivos en la región, entre estos el llamado “limón mexicano” e hicieron experimentos con la finalidad de obtener árboles productivos, resistentes a plagas y enfermedades, logrando establecer huertos comerciales en 1915.

En el 2008 en México, se produjeron 1.45 millones de toneladas de limón mexicano, de las cuales 75% se produjo en dos entidades: Colima (45%) y Michoacán (30 por ciento). (Almanza, 2009).

2.2.2. Propiedades de los cítricos.

Los cítricos se caracterizan fundamentalmente por sus frutos grandes que contienen cantidades abundantes de vitamina C, limonoides, flavonoides (limoneno, citral, linalol, citronelal, nerol, etc.) les otorgan aromas muy profundos. Por ejemplo, las flores de las naranjas, se conocen por su particular aroma conocido como aroma de azahar. Estos aromas naturales pueden ser extraídos y aprovechados en un uso industrial para la obtención de perfumes y aromatizantes.

Son precisamente estos fitoquímicos los que otorgan a estas plantas sus propiedades medicinales tan características. Son reconocidas sus propiedades antioxidantes capaces de neutralizar los radicales libres, e impedir el desarrollo de células cancerosas. No menos importantes son sus propiedades antiinflamatorias o su capacidad para prevenir la formación de coágulos en la sangre, responsable de numerosos accidentes cardiovasculares o su capacidad para protegernos y curarnos las enfermedades de los ojos. Dentro de los fitoquímicos, los más numerosos son los flavonoides con elevadas cantidades de carotenos (en forma de betacarotenos), de rutina, hesperidina, luteína, licopeno, etc. La vitamina C que proporcionan la mayoría de sus frutos, además de ser un potente antioxidante, ha sido utilizada desde siempre por sus propiedades antiescorbútcas y para mejorar la recuperación y los síntomas en enfermedades como la gripe y el resfriado. (“Los cítricos”, 2012).

2.2.3. Especies principales de cítricos.

Naranja amarga (*Citrus aurantium L.*): Con el fruto de corteza más arrugada y pulpa más amarga. Alas con el peciolo más ancho y ramas espinosas.

Limoneno (*Citrus limón (L.) Burm*): Con las flores interiormente blancas pero con los extremos rosados y fruto de corteza gruesa y amarillo brillante cuando está bien maduro.

Cidro o toronjo (*Citrus médica L.*): Muy parecido al limoneno pero de frutos más grandes y más redondeados, de corteza más gruesa y jugo más agrio. Normalmente llega a los 3 o 5 m. Originario de Asia, es cultivado en los países mediterráneos.

Pomelo (*Citrus paradisi Macfaydyen in Hooker*): De hasta 8 metros de altura. Con flores más grandes y frutos más redondeados, de piel muy gruesa (Pomelo). Originario de la China y cultivado en los países de clima benigno, especialmente mediterráneos.

Mandarino (*Citrus deliciosa Ten*): De hasta 8 m., mucho menos redondeado que el resto. Hojas estrechas y fruto aplanado con la corteza que se separa fácilmente de los gajos, que es más dulce que el resto de citrus. (“Los cítricos”,2012).

2.3. Aceites esenciales.

Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas y a ciertos extractos de origen animal (almizcle, civeta, ámbar gris). Se trata de productos químicos intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles por naturaleza (se evaporan rápidamente) y livianos (poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire. Se han extraído más de 150 tipos, cada uno con su aroma propio y virtudes curativas únicas. Proceden de plantas tan comunes como el perejil y tan exquisitas como el jazmín. Para que den lo mejor de sí, deben proceder de ingredientes naturales brutos y quedar lo más puro posible. (“Aceite esencial”, 2012).

2.3.1. Técnicas de Extracción de Aceites Esenciales.

Enfleurage.

Para esto se utilizan grasas naturales con puntos de ablandamiento alrededor de 40 °C. Se extiende en bandejas ó “chassis” en profundidad no mayor a 0.5 cm y sobre ella se colocan los pétalos de flores ó el material vegetal, desde donde se van a extraer los principios odoríficos, el contacto puede durar de 3 a 5 días. Luego el material vegetal es removido y reemplazado por material fresco, esta operación se repite buscando la saturación de la grasa. Posteriormente la grasa impregnada del principio activo, “le pomade”, se lava con alcohol libre de congéneres (alcohol de perfumería). El alcohol se filtra y se destila a vacío (21 in Hg, T 30 °C) hasta recuperar un 80 % del volumen de alcohol, como mínimo, en el fondo queda un residuo llamado “absolute”. (Sánchez, 2006).

Extracción con solventes.

El material previamente debe de ser molido, macerado ó picado, para permitir mayor área de contacto entre el sólido y el solvente. El proceso ha de buscar que el sólido, ó el líquido, ó ambos, estén en movimiento continuo (agitación), para lograr mejor eficiencia en la operación. Se realiza preferiblemente a temperatura y presión ambientes. El proceso puede ejecutarse por batch (por lotes ó cochadas) ó en forma continua (percolación, lixiviación, extracción tipo soxhlet). Los solventes más empleados son: Etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo; no se usan clorados ni benceno por su peligrosidad a la salud. Los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados.

El solvente adicionalmente extrae otros componentes como colorantes, gomas, mucílagos, ceras, grasas, proteínas, carbohidratos. En la etapa de recuperación de los solventes (atmosférica ó al vacío), después de los condensadores ha de disponerse de una unidad de enfriamiento, para la menor pérdida del solvente. El material residual en la marmita de destilación, contiene concentrados las materias odoríficas y se le conoce como “concrete”.

En caso de emplear glicoles, aceites vegetales, aceites minerales, como solventes extractores, los componentes odoríficos son imposibles de recuperará desde allí y el producto se comercializa como un todo, conocido como “extractos”. (Sánchez, 2006).

Extracción por prensado.

También se le conoce como “expresión”. El material vegetal es sometido a presión, bien sea en prensas por lotes ó en forma continua, dentro de éstos se tienen los equipos: Tornillo sin fin de alta ó de baja presión, extractor Expeller, extractor centrífugo, extractor Decanter y rodillos de prensa.

Para los cítricos antiguamente se empleó el método manual de la esponja, especialmente en Italia, que consiste en exprimir manualmente las cáscaras con una esponja hasta que se empapa de aceite, se exprime entonces la esponja y se libera el aceite esencial.

Otros métodos corresponden a raspado, como el del estilete, donde la fruta se pone a girar en un torno y con un estilete se raspa la corteza únicamente; permanentemente cae un rocío de agua que arrastra los detritos y el aceite liberado. Otro proceso emplea una máquina de abrasión similar a una peladora de papas, la “pellatrice” y también hace uso del rocío de agua. En estos procesos la mezcla detritos-agua-aceite se centrifuga a 5000 rpm durante 40 minutos y el aceite esencial recuperado se coloca en una nevera a 3°C durante 4 horas, para solidificar gomas y ceras que se localizan en la superficie. El aceite esencial se guarda en recipientes oscuros a 12 °C. Los aceites obtenidos por prensado y/o raspado, se les comercializa como “expresión en frío” y cumplen la función de odorizantes (smell oils) y saborizantes (taste oils). (Sánchez, 2006).

Hidrodestilación.

En este proceso en la parte inferior del tanque extractor, el cual es normalmente basculante, se coloca agua, luego viene encima una parrilla que soporta el material que va a ser extraído. La salida de vapores, puede ser lateral al tanque o ubicarse en la tapa, pasa a un serpentín enfriado por agua y posteriormente el vapor condensado y el aceite esencial se recolectan en un separador de fases, el cual debe de tener la suficiente altura y diámetro para evitar la pérdida de aceite y además permita la recolección fácil del mismo. El tanque extractor es calentado con fuego directo en su parte inferior (el fondo y hasta 1/3 de la parte inferior del tanque se construye en alfajor de 1/8 in, material que resiste bien el calor y la oxidación), el vapor producido allí causa el arrastre del aceite esencial. (Sánchez, 2006).

Capítulo 3. JUSTIFICACIÓN.

La demanda actual de productos orgánicos y la creciente necesidad de combatir los diferentes microorganismos patógenos presentes en los alimentos, generan la necesidad de estudiar las diferentes propiedades contenidas en algunos de los frutos cítricos que ya han presentado antecedentes como sanitizantes, y que como tal, se pretende comprobar para elaborar un producto que reúna las características convenientes.

Los aceites esenciales son usados como agentes carminativos, estimulantes, diuréticos y anti-reumáticos; algunos poseen propiedades insecticidas, antifúngicas y antibacterianas frente a microorganismos patógenos y han sido considerados como ingredientes activos en algunos plaguicidas botánicos, debido a su eficacia frente a un número considerable de plagas, su toxicidad mínima en mamíferos y su disponibilidad general. (Sánchez y col., 2009).

Por ello, en los últimos años se han realizado investigaciones, que han demostrado el poder antimicrobiano de los aceites esenciales, especialmente los extraídos de frutas cítricas; en estos estudios se puede mencionar el de Dabbah y col., 1970, quienes encontraron que los aceites esenciales de mandarina, naranja y toronja mostraron tener actividad antibacteriana contra cepas bacterianas de: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* entre otras. Así mismo, el trabajo de Morales (1996) demostró que el aceite esencial de lima posee una actividad antibacteriana contra *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* y *Streptococcus lactis*.

Estos resultados hacen relevantes el estudio de los aceites esenciales especialmente de cítricos debido a la gran importancia que tienen para la industria farmacéutica y de alimentos. Se sabe que los aceites esenciales, utilizados como aditivos en los alimentos tienen efecto antimicrobiano y actúan al mismo tiempo como saborizante.

Así pues, al situar al estado de Michoacán como uno de los principales productores en limón y toronja, da la oportunidad de llevar a cabo esta línea de investigación con amplias posibilidades de obtener el fruto de interés.

3.1. OBJETIVOS.

3.1.1. Objetivo general.

Identificar propiedades microbidas y fungidas en: cáscara, semilla y fruto entero de cítricos mediante extracción por prensado.

3.1.2. Objetivos específicos.

- Extraer las diferentes partes del cítrico mediante extracción por prensado.
- Clasificar algunos de los principales componentes de los cítricos en estudio.
- Evaluar la actividad microbida y fungida de los extractos obtenidos con la finalidad de comprobar las propiedades de interés.
- Determinar los halos de inhibición a través de la prueba de susceptibilidad por el método de difusión de disco de los extractos.
- Determinar por cromatografía de gases algunos de los componentes de los extractos.

3.2. HIPÓTESIS.

El uso de la extracción de los compuestos de interés por prensado, del fruto entero, de la semilla y finalmente de la cáscara permitirá la separación, así como conservar la funcionalidad de los principios activos presentes en los cítricos a estudiar, lo que permitirá tener pruebas de actividad bactericida y microbida más eficientes.

Capítulo 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

El trabajo se realizó en el laboratorio de Ingeniería Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia, en el laboratorio de Biotecnología y laboratorio de Investigación en Ingeniería Ambiental en el Edificio “V1” de Posgrado en Ingeniería Química de la UMSNH.

Se seleccionaron cuatro variedades de cítricos producidos en la región de Tierra Caliente del Estado de Michoacán a los cuales se les asignó la siguiente nomenclatura:

- Cítrico 1
- Cítrico 2
- Cítrico 3
- Cítrico 4

La extracción y el análisis de los compuestos antimicrobianos se efectuaron de la siguiente manera:

4.1. Preparación de las muestras.

Previamente se examinó el color, tamaño y forma de los cítricos, se procedió a lavarlos con agua limpia y jabón con la finalidad de eliminar cualquier impureza que pueda interferir en los resultados. Una vez secos, posteriormente se realizó la separación de fruto completo (contiene cáscara, pulpa y semillas), cáscara y semilla.



Figura 1. Preparación de las muestras (Fuente: Trujillo, 2012).

4.2. Extracción por prensado.

Se utilizó el método de prensado, es uno de los más utilizados a nivel planta piloto, ya que con él se minimiza la oxidación de compuestos oxigenados o cualquier otro deterioro.

Tomando en cuenta 500 gramos de cada uno de los cítricos se llevó a cabo la extracción por prensado en frío a temperatura ambiente del fruto completo, cáscara y semilla, en el caso de la cáscara y semilla se utilizaron 50 ml de agua destilada como solvente. Una vez obtenida las muestras se filtraron y posteriormente se efectuó una centrifugación a 5000 rpm durante un tiempo de 25 minutos; esto con la finalidad de eliminar residuos no deseados.

4.3. Determinación de pH.

Para la medición de pH de cada una de las muestras se utilizó un potenciómetro marca HANNA 20V, previamente calibrado con soluciones de pH conocido.

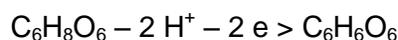


Figura 2. Potenciómetro marca HANNA 20V (Fuente: Trujillo, 2012).

4.4. Determinación de Ácido Ascórbico por Método de Titulación.

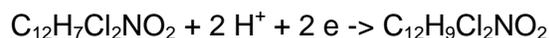
4.4.1. Definición y Principio del Método.

El ácido ascórbico, así como sus sales y ésteres, se pueden determinar por valoración con 2,6-diclorofenol-indofenol (DPIP) o por medio de la polarografía, oxidándose el ácido ascórbico para obtener ácido dehidro ascórbico:



ácido ascórbico -> ácido dehidro ascórbico

Si se usa 2,6-diclorofenol-indofenol como reactivo, se le reduce por medio de ácido ascórbico:



Determinación de ácido ascórbico por método de titulación

Se preparó una solución estándar de ácido ascórbico (1mg/ml), a la cual se le adicionó una solución de ácido metafosfórico-ácido acético para valorar el 2,6-dicloroindofenol.

Posteriormente se tituló un blanco compuesto por la solución extractora más el volumen gastado en la titulación para la valoración. Donde el valor obtenido del estándar se restó el del blanco y la concentración de indofenol se expresó como mg de ácido ascórbico equivalentes a 1ml de indofenol.

Para la determinación del contenido de ácido ascórbico en la muestra se preparó una solución de solución extractora-muestra 6:1, y se procedió a titular hasta observar un tono rosa ligero.

4.4.2. Procedimiento.

1. Preparar una solución estándar de ácido ascórbico. Para 10 ml de solución, pesar 10 mg de ácido ascórbico y se añade agua destilada aforando hasta 10 ml.
2. Preparar una solución de ácido acético – ácido metafosfórico (solución extractora). Para 500 ml de solución, pesar 15 gramos pulverizar. Diluir en 40 ml de ácido acético y 200 ml de agua destilada. Aforar hasta 500 ml.

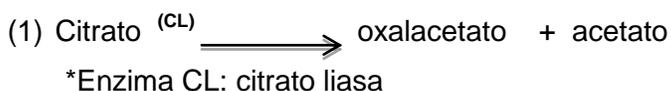
3. Preparar el 2,6-dicloroindofenol, pesar 0.5 gramos y disolver en agua destilada hasta un volumen de 200 ml.
4. En un matraz transferir 2 ml de la solución de ácido ascórbico y 5 ml de solución de ácido acético – ácido metafosfórico. Titular con el 2,6-dicloroindofenol hasta que viré a un color rosa ligero.
5. Para valorar las muestras se sigue el paso 4, solo que se reemplaza la solución de ácido ascórbico por la muestra.
6. Para la determinación del ácido ascórbico en cada muestra se utiliza el volumen gastado en la titulación del estándar (paso 4), y el volumen gastado en cada muestra. Se determina con la siguiente fórmula:

$$\text{mg. Ácido Ascórbico} = \frac{\text{volumen titulación muestra}}{\text{volumen titulación estándar}}$$

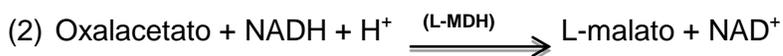
(Carriedo y col., 2011)

4.5. Kit Enzimático para la Identificación de Ácido Cítrico Megazyme®.

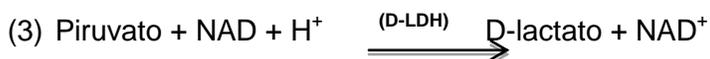
4.5.1. Fundamento.



El oxalacetato que se produjo se hace reaccionar en presencia de NADH y de la enzima L-malato deshidrogenasa a fin de producir NAD.



Es posible encontrar la enzima oxalacetato descarboxilasa presente en la muestra, de ser así parte del oxalacetato producido es convertido en piruvato. Para asegurar que todo el ácido cítrico presente se está cuantificando, se utiliza la enzima D-lactato deshidrogenasa para convertir todo el piruvato producido en D-lactato y NAD⁺.



La cantidad de NAD^+ producido en la vía de reacciones presentadas es estequiométrica con la cantidad de ácido cítrico presente. La cantidad de NADH consumido es medido por la disminución de absorbancia a 340 nm.



Figura 3. Kit Enzimático Ácido Cítrico Megazyme® (García y col., 2011).

4.5.2. KIT y Preparación de Reactivos.

Botella 1: Buffer (40 ml, pH 7.5) más azida de sodio (0.02%) como conservador

Botella 2: Tabletas que contienen NADH y PVP*

*Polivinilpirrolidona incorporado para prevenir la inhibición causada por taninos.

Botella 3: L-malato deshidrogenasa más D-lactato deshidrogenasa

Botella 4: Citrato Liasa liofilizado

Botella 5: Solución Estándar de Ácido Cítrico en 0.02% de azida de sodio.

- Disolver una tableta de la botella 2 en 2 ml de buffer (botella 1) más 2.5 ml de agua destilada.
- Disolver el contenido de una de las botellas 4 en 0.55 ml de agua destilada.

4.5.3. Procedimiento.

Longitud de onda: 340nm.

Celda (lectura en espectrofotómetro): 1 cm espesor, plástico.

Temperatura ambiente.

Volumen final: 1.37 ml.

Lectura utilizando como blanco agua destilada.

Tabla 1. Procedimiento Kit Ácido Cítrico Megazyme®

Pipetear en las celdas	Blanco (μl)	Muestra (μl)
Agua destilada	850	750
Solución Muestra		100
Solución 2 (buffer/NADH/PVP)	500	500
Suspensión 3 (L-MDH/D-LDH)	10	10

--Pre reacción: mezclar perfectamente y leer las absorbancias de las soluciones (A_1) después de aproximadamente 4 minutos.

Comenzar la reacción adicionando

Solución 4 (CL)	10	10
-----------------	----	----

--Mezclar y leer la absorbancia de la solución (A_2) al término de la reacción aproximadamente después de 5 minutos.

El blanco consiste en la adición de los reactivos sin incorporar muestra, a fin de tomar esta lectura como patrón para los cálculos de concentración de ácido cítrico.

Las muestras que se analizaron se utilizaron en una dilución 1:10 en agua destilada

Cálculos

Una vez que se obtuvo la lectura de absorbancia de las soluciones preparadas a lo largo del procedimiento. Se determina la diferencia de absorbancias ($A_1 - A_2$) para ambos, tanto el blanco como la muestra tratada.

A partir de ambas diferencias se resta la diferencia de absorbancia del blanco de la diferencia de absorbancias de la muestra.

$$\Delta A_{\text{ácido cítrico}} = \Delta A_{\text{muestra}} - \Delta A_{\text{blanco}}$$

A continuación se calculó la concentración de ácido cítrico de la siguiente manera

$$c = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{\text{ácido cítrico}}$$

En donde:

V = volumen final = 1.37 ml.

PM = peso molecular del ácido cítrico = 192.1 g/mol

ε = coeficiente de extinción molar del NADH a 340nm = 6300 ($\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

d = espesor de la celda = 1cm

v = volumen de la muestra = 0.10ml.

Debido a que las muestras analizadas se encontraban en dilución 1:10 fue necesario multiplicar las concentraciones obtenidas del cálculo anterior por un factor de dilución F.

Por lo tanto la concentración final quedó de la siguiente manera

$$c_{\text{final}} = Fc = 10 \times c$$

(Mollering, 1989).

Para la prueba de Kit Enzimático para la Identificación de Ácido Cítrico Megazyme® tomar en cuenta un pH en los extractos aproximado de 7 con 1 M NaOH.

4.6. Acidez total.

4.6.1. Definición y Principio del Método.

La acidez se refiere a la proporción de ácidos grasos libres que contiene el aceite, expresada en grados. Estos grados no tienen relación con la intensidad del sabor. Quede claro, que los grados de acidez del aceite son una pauta para catalogar, pero no guardan ninguna relación con el sabor.

Estimación del aceite con una solución valorada de hidróxido de sodio utilizando fenolftaleína como indicador del punto de equivalencia.

La acidez total de las muestras se determinó por un método de titulación con Hidróxido de sodio 0.1N. Se llevó a cabo por triplicado con una dilución de la muestra 1:6 aceite: agua descarbonatada.

Para las muestras comerciales se colocaron 1 ml de muestra en un matraz Erlenmeyer y 6 ml de agua descarbonatada, añadiendo como indicador 2 gotas de fenolftaleína. Se prosiguió a la valoración con el NaOH hasta que la mezcla del matraz virara a un color rosa y que dicho color se mantuviera por 1 minuto. Para los extractos se siguió el mismo procedimiento, pero con 50 μ l de muestra y 300 μ l de agua descarbonatada.

La acidez titulable es expresada como porcentaje de ácido sulfúrico.

4.6.2. Metodología.

Paso 1.

Previo a la valoración de la solución de NaOH, más adelante se indica el procedimiento.

- Pesar 2 gr de biftalato de potasio en 1 vidrio de reloj.
- Llevar a horno a 100°C durante 1 hora (Para secar).
- Dejar enfriar en desecador.
- Llevar 3 vasos de precipitado a peso constante.
- Hervir 400 ml de agua por 8 minutos para descarbonatar.

- Dejar enfriar.

Paso 2.

Solución de hidróxido de sodio 0.1N

Para 1 litro de NaOH 0.1 N

Peso molecular = 40 gr/mol

Pureza 97%

Usando la fórmula:

$$m = M * V * PM$$

- Pesar 4.1237 gr NaOH
- Disolver en 500 ml de H₂O destilada.
- Etiquetar y guardar en botella color ámbar.

En una balanza común pesar 4.1237 gramos de NaOH, colocarlo en un Erlenmeyer ayudándose con un “embudo” de papel, luego comenzar a agregar el agua destilada enfriando constantemente el matraz, debido a que la reacción es fuertemente exotérmica y se desprenden vapores cáusticos, realizar el agregado de agua destilada al hidróxido de sodio en un Erlenmeyer tipo Pyrex, que a su vez este sumergido en un baño de agua fría y bajo campana. Con aproximadamente 600 ml de agua para lograr disolver gran parte del NaOH. Evitar llenar el matraz antes de disolver en su totalidad el NaOH, para completar con agua se debe esperar a que se enfríe el líquido, ya que puede liberar una gran cantidad de calor, si se encuentra caliente.

Paso 3.

Solución de fenolftaleína al 2% en etanol neutro al 95%-96% volumen.

Pesar 2 gr. De fenolftaleína en una balanza común, colocar en un vaso de bohemia de 250 ml, disolver con 100ml de etanol neutro al 95%-96% volumen.

Paso 4.

Valoración de hidróxido de sodio 0.1 N biftalato de potasio.

- Pesar 0.408 gr de biftalato de potasio en vaso de precipitado (a peso constante).
- Disolver en 100 ml de agua descarbonatada en cada vaso.
- Agregar de 1 a 2 gotas de fenolftaleína 2%.
- Llenar la bureta con solución de NaOH 0.1N antes preparada.
- Titular (viraje rosa).

Cálculos:

$$N = \frac{\text{Peso Biftalato}}{\text{MEQ biftalato} * (\text{ml NaOH})}$$

MEQ = 0.20422

Peso Biftalato= debe ser el peso exacto que se puso en los vasos de precipitado.

ml NaOH = mililitros gastados de NaOH para titulación.

La titulación se debe realizar por triplicado. Promediar N1, N2 y N3 siempre y cuando no se difieran más de 0,001 N. Si alguna de ellas difiere en más de 0,001 N se deben realizar más determinaciones y promediar aquellas que difieran en menos de 0,001N. Expresar el resultado al 0,001N.

El factor que afectará al gasto de la solución de hidróxido de sodio se calcula según la fórmula:

$$F = NR / 0.1$$

Donde NR es la normalidad calculada.

Paso 5.

Titulación de las muestras de los diferentes cítricos, para determinación de acidez total.

Procedimiento.

En un matraz Erlenmeyer se colocan 1 ml de aceite, se agregan de 1 a 2 gotas de fenolftaleína y 6 ml de agua destilada descarbonatada.

Valorar desde bureta con solución de hidróxido de sodio 0.1 N hasta llegar a la coloración de fenolftaleína en medio básica. Tener en cuenta que dicha coloración estará influenciada por el aceite. Sea G el gasto de hidróxido de sodio obtenido expresado en ml.

Paso 6.

Expresión de resultados

La acidez total se expresara con dos cifras decimales en gramos de ácido sulfúrico por litro de aceite:

$$\text{gH}_2\text{SO}_4/\text{L aceite} = 0.98 \times G \times F$$

Siendo F el factor de corrección del hidróxido de sodio.

Y para sacar el porcentaje de acidez total por litro de solución se usa:

$$\% \text{ acidez} = \frac{V_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}} * \text{meq}_{\text{ácido X}} * 100}{V}$$

Siendo:

V_{NaOH} : Volumen de NaOH gastados en la titulación.

N_{NaOH} : Normalidad del NaOH.

$\text{Meq}_{\text{ácido X}}$: miliequivalente del ácido cítrico.

V : Volumen de la muestra usado.

(Carriedo y col., 2011)

4.7. Determinación del Halo de Inhibición en Antibiógramas.

Esta prueba fue realizada por el método de difusión de Kirby-Bauer (siguiendo las normas de la National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS de Estados Unidos de América) (PAL, 2007) recomienda para la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Para ello se utilizaron discos de papel filtro de 5 mm de diámetro, en los cuales se añadió volúmenes de 0.5 µl de los diferentes extractos de cítricos, enfrentados a microorganismos patógenos de interés clínico (bacterias y levaduras) como: *Bacillus subtilis* (gram negativa), *Escherichia coli* (gram negativa), *Pseudomonas aeruginosa* (gram negativa), *Staphylococcus aureus* (gram positiva), *Candida utilis*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*. Las cepas fueron activadas en 5 ml de TSB a 37°C por 24-48 horas. Con una turbidez ajustada a 0.5 en la escala arbitraria de McFarland, se sembró en agar Mueller Hinton en el caso de las bacterias y en medio YPD para levaduras, para luego llevar a incubación por un periodo de 18-24 horas a una temperatura de 35°C (bacterias) y 28°C (levaduras) para determinar inhibición de crecimiento.

La actividad antibacteriana del aceite esencial se determinó midiendo el halo de inhibición alrededor de cada orificio (la distancia desde el borde del orificio hasta donde termina el halo) con ayuda de una regla milimetrada por la parte posterior de la placa (Panacek y col., 2006), el tamaño de esta zona de inhibición, indica si las bacterias objeto de análisis tienen una sensibilidad: sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) frente a los diferentes extractos cítricos, basándose en diferentes tipos de antibióticos.

Las interpretaciones seguirán las normas establecidas por el NCCLS, pero, por regla general, un diámetro de inhibición de 30 a 35 mm es indicativo de una cepa altamente sensible, mientras que diámetros de zona de inhibición inferiores a 15 mm son los que presentan las cepas resistentes (Carriedo y col., 2011).

En todos los casos la evaluación se realizó por triplicado y se emplearon como control discos para antibiograma disponibles en el comercio, discos impregnados con agua destilada que fue el solvente utilizado para la obtención de los extractos y en el caso de las levaduras se utilizaron los siguientes antimicóticos: ketoconazol, itraconazol, miconazol.

Tabla 2. Comparación de Halos de Sensibilidad en mm (NCCLS).

Clave	Antibiótico	Concentración	R (igual o menor)	I (entre)	S (igual o mayor)
AK	Amikacina	30 mcg	14	15-16	17
AM	Ampicilina	10 mcg			
	<i>Enterobacteriaceae</i>		11	12-13	14
	<i>Staphylococcus sp.</i>		28	---	29
	<i>Enterococos</i>		16	---	18
	<i>Streptococos</i>		21	---	30
CB	Carbenicilina	100 mcg			
	<i>Enterobacteriaceae</i>		18	18-22	23
	<i>Pseudomonas sp.</i>		13	14-16	17
CF	Cefalotina	30 mcg	14	15-17	18
CFX	Cefotaxima	30 mcg	14	---	23
CTZ	Ceftazidima	30 mcg	14	15-17	18
CTX	Ceftriaxona	30 mcg	13	---	21
CXM	Cefuroxima	30 mcg	14	15-17	18
CPF	Ciprofloxacina	5 mcg	15	16-20	21
CLM	Cindamicina	30 mcg	14	15-20	21
CL	Clorafenicol	30 mcg	12	13-17	18
DC	Dicloxacilina	1 mcg	--	---	--
	<i>Staphylococcus sp.</i>		10	11-12	13
ENX	Enoxacina	10 mcg	14	15-17	18
E	Eritromicina	15 mcg	13	14-17	18
GE	Gentamicina	10 mcg	12	13-14	15
NET	Nentilmicina	30 mcg	12	13-14	15
NF	Nitrofurantoína	300 mcg	14	15-16	17
NOF	Norfloxacina	10 mcg	12	13-16	17
PE	Penicilina	10 U			
	<i>Enterococos</i>		14	---	15
	<i>Streptococos</i>		19	20-27	28
	<i>Staphylococcus sp</i>		28	---	29
	<i>N.gonorrhoeae</i>		19	---	20
	<i>Neumococos</i>		19	---	20
SXT	Sulfametoxadol Trimetroprim	25 mcg	10	11-15	16
TE	Tetraciclina	30 mcg	14	15-18	19
VA	Vancomicina	30 mcg	--	---	--
	<i>Enterococos</i>		14	15-16	17
	<i>Staphylococcus aureus</i>		--	---	15

4.8. Análisis de Ácido Cítrico y Ácido Ascórbico por HPLC.

Se utilizó un HPLC

- Columna: C18 L25 cm x 4.6 mm D.I.
- Fase móvil A: 20 Mm fosfato monobásico (KH_2PO_4).
0.1% de Ácido o-fosfórico en agua, 1% metanol.
- Fase móvil B: Metanol
- Flujo fase móvil: 1 ml / min.
- Detector: UV-VIS a 215 nm.

Curva Ácido Ascórbico.

Se corrieron dos curvas de calibración una a bajas y otra a altas concentraciones del estándar de ácido ascórbico.

Para el cálculo de la concentración de estándar, se consideran 20 μl que es el volumen de la muestra.

Peso del estándar (g)= 0.0209

Volumen de aforo (ml) = 10

Volumen de aforo (L)= 0.01

Concentración (g/L) = $\frac{\text{peso del estándar}(g) \cdot 1 \text{ litro}}{\text{volumen de aforo}(L)}$

Factor (g/L) = 2.09

La concentración estándar se calcula con base en 20 μl , aplicando el factor que corresponda.

Curva Ácido Cítrico.

Se corrieron dos curvas de calibración una a bajas y otra a altas concentraciones del estándar de ácido cítrico.

Para el cálculo de la concentración de estándar, se consideran 20 µl que es el volumen de la muestra.

Peso del estándar (g)= 0.0215

Volumen de aforo (ml) = 10

Volumen de aforo (L)= 0.01

Concentración (g/L) = $\frac{\text{peso del estándar (g)} * 1 \text{ litro}}{\text{volumen de aforo (L)}}$

Factor (g/L) = 2.15

La concentración estándar se calcula con base en 20 µl, aplicando el factor que corresponda.

Para el análisis de Ácido Ascórbico y Ácido Cítrico.

Se realiza un tratamiento de las muestras:

Pesar y disolver en agua HPLC

Filtración en membranas de 0.45 micras.

Concentración g/100 g (%) Ácido Cítrico y Ácido Ascórbico

$$= \left(\frac{\text{concentración de acuerdo a la curva de calibración } \left(\frac{g}{L}\right) * \text{convertir de litros a } \mu l}{1000000 * \text{volumen de inyección } \mu l} * \frac{100}{\text{peso de muestra (g)}} \right)$$

4.9. Espectrometría de absorción en el infrarrojo.

La moderna espectrometría en el infrarrojo es una herramienta versátil que se aplica a la determinación cualitativa y cuantitativa de especies moleculares de todo tipo. La región del infrarrojo medio que se extiende entre aproximadamente 670 y 4.000 cm^{-1} (2.5 y 14.9 μm). En esta región, para los análisis cualitativos y cuantitativos, se emplean los espectros de absorción, reflexión y emisión. Para determinar la caracterización química de materiales orgánicos e inorgánicos, sólidos o líquidos, mediante espectroscopia de infrarrojo (FTIR) en las modalidad de infrarrojo medio (MIR) se utilizó un espectrómetro FT-IR marca Perkin-Elmer, en donde se colocó una gota del componente a analizar en una celda de NaCl. (Skoog y col., 2008)

Tabla 3. Principales aplicaciones de la espectrometría en el infrarrojo. (Skoog y col., 2008)

Región espectral	Tipo de medida	Tipo de análisis	Tipo de muestra
Infrarrojo medio	Absorción	Cualitativa	Compuestos sólidos, líquidos o gaseosos puros
		Cuantitativa	Mezclas complejas de gases, líquidos o sólidos
		Cromatográfico	Mezclas complejas de gases, líquidos o sólidos
	Reflectancia	Cualitativa	Compuestos sólidos puros o líquidos
	Emisión	Cuantitativa	Muestras atmosféricas



Figura 4. Espectrómetro FT-IR marca Perkin-Elmer. (Trujillo, 2012)

4.10. Cromatografía de gases.

Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Varian 3800, inyector Split-splitless a una temperatura de 250°C, se manejó una relación de Split de 2 con una columna capilar HP-FFAP de 50m de longitud, 0.32 mm Diámetro Interno y 0.5 micras de espesor de película, detector de ionización de flama, el rango de detector de 12.

El programa de temperatura de la columna, se manejó una temperatura inicial de 40 °C se mantiene 1 min, primera rampa de 20 °C/min hasta 140 °C, segunda rampa de 5 °C/min hasta 180 °C, tercera rampa de 20 °C/min hasta 230 °C se mantiene 15 min.

Se inyectó 1 µl de la mezcla estándar, así como de cada uno de los diferentes extractos cítricos.



Figura 5. Cromatógrafo de gases marca Varian 3800. (Trujillo, 2012)

Capítulo 5. RESULTADOS.

5.1. Resultados pH mediante potenciómetro.

En los resultados de la tabla podemos observar que se obtuvieron valores menores que 7, lo que indica, que los diferentes tipos de extractos cítricos son ácidos, con un mayor valor de acidez el cítrico 1 y cítrico 2, esto a consecuencia de que la pulpa, también contiene ácidos orgánicos, fundamentalmente ácido cítrico y en menor cantidad málico (que se consideran responsables del sabor ácido de este alimento), acético y fórmico. Algunos estudios han indicado que estos ácidos potencian la acción de la vitamina C y poseen un notable efecto antiséptico. (Tomatake, 2006).

Los jugos cítricos, en general, poseen una relativamente elevada actividad acuosa, mediano porcentaje de azúcares y alto de ácidos orgánicos lo cual redundaría en un bajo pH. La actividad acuosa es un parámetro estrechamente ligado a la humedad del alimento lo que permite determinar su capacidad de conservación, de propagación microbiana, etc. (ICMSF, 1990).

Al bajar el pH de un alimento, aumenta la proporción de las moléculas disociadas de un determinado ácido orgánico, aumentando de esta forma su efectividad como agente antimicrobiano. (Van Der Becke, 1999).

Tabla 4. Valores de pH para cada uno de los extractos analizados.

Muestra		pH
Fruto completo	Cítrico 1	2.17
	Cítrico 2	2.31
	Cítrico 3	3.82
	Cítrico 4	3.54
Cáscara	Cítrico 1	4.04
	Cítrico 2	4.52
	Cítrico 3	5.55
	Cítrico 4	5.18
Semilla	Cítrico 1	4.64
	Cítrico 3	4.73
	Cítrico 4	5.58

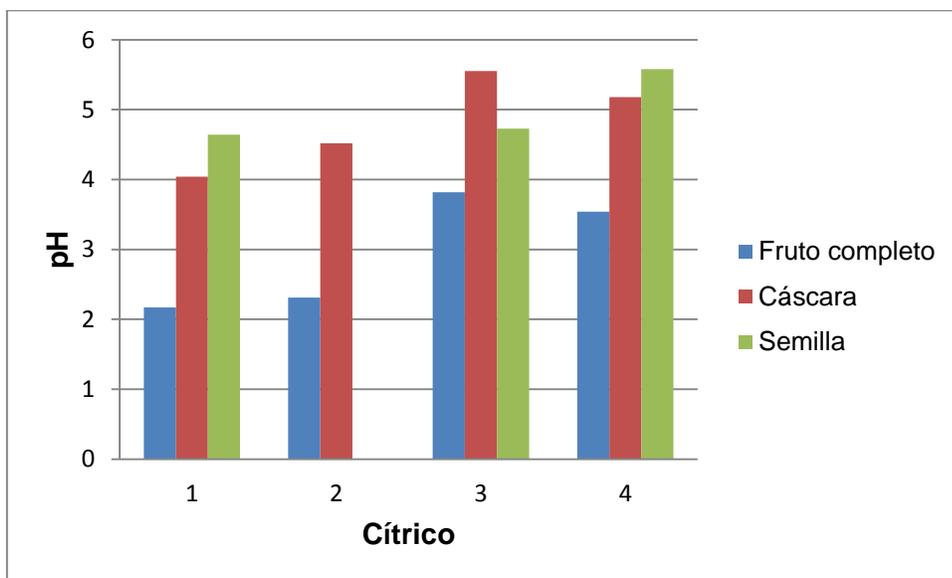


Gráfico 1. Determinación de pH.

5.2. Ácido Ascórbico.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla, muestran que el fruto completo del cítrico 3 y 4 tiene una mayor cantidad de mg de ácido ascórbico, lo que hace suponer que este valor se deba a que es un fruto muy rico en vitamina C, esta riqueza le viene dada por su contenido en ácido ascórbico.

Las variaciones en el contenido de ácido ascórbico pueden deberse a diversos factores, tales como variedades, prácticas de cultivo y maduración (Ting, 1980).

Tabla 5. Ácido Ascórbico por método de titulación.

Muestra		Temperatura °C	ml gastados 2,6 Dicloroindofenol	mg de Ácido Ascórbico	mg Ácido Ascórbico /100 ml	g/L
Fruto completo	Cítrico 1	25	0.020	0.0500	2.50	0.0250
	Cítrico 2	25	0.010	0.0250	1.25	0.0125
	Cítrico 3	25	0.170	0.4250	21.25	0.2125
	Cítrico 4	25	0.240	0.6000	30.00	0.3000
Cáscara	Cítrico 1	25	0.010	0.0250	1.25	0.0125
	Cítrico 2	25	0.025	0.0625	3.13	0.0313
	Cítrico 3	25	0.001	0.0025	0.13	0.0013
	Cítrico 4	25	0.001	0.0025	0.13	0.0013
Semilla	Cítrico 1	25	0.001	0.0120	0.60	0.0060
	Cítrico 3	25	0.001	0.0052	0.26	0.0026
	Cítrico 4	25	0.001	0.0052	0.26	0.0026

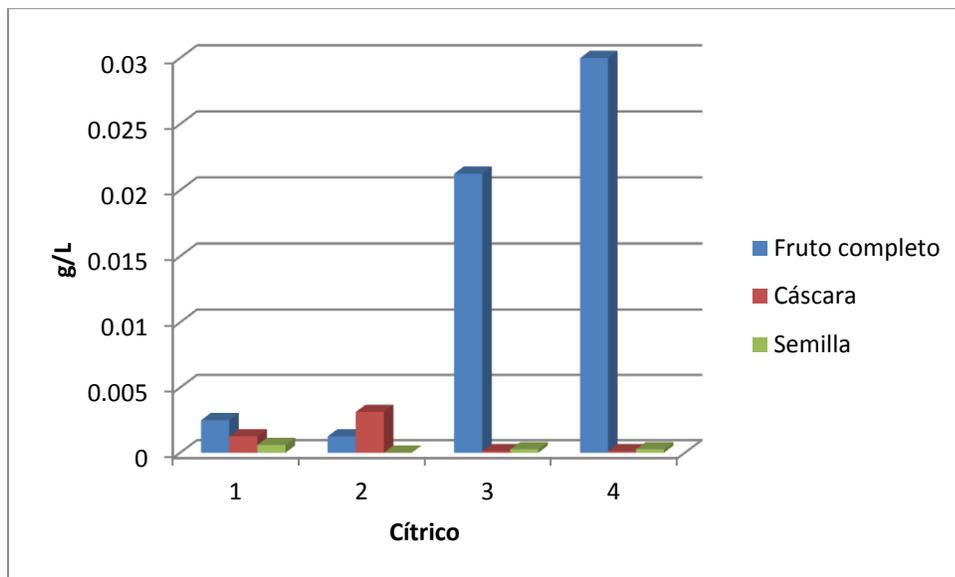


Gráfico 2. Ácido Ascórbico.

5.3. Identificación de Ácido Cítrico mediante kit Megazyme®.

Como se muestra en los resultados de la siguiente tabla, el cítrico 1 y cítrico 2 de fruto completo contienen una mayor concentración de ácido cítrico, de esta manera podemos corroborar que para la determinación de ácido cítrico en jugos de frutas, en este caso de cítricos, deben de tener una concentración entre 0.04 y 0.4 g/L (Soler, 2009), en donde se observa que la concentración de ácido cítrico en la mayoría de las muestras coincide con lo publicado.

Es importante tomar en cuenta que el valor de pH tiene un papel fundamental en este análisis, ya que a valores de pH menores a 3 se obtiene una mayor producción de ácido cítrico, evitando la formación de ácidos glucónicos y oxálico, ya que estos se pueden producir a valores de pH altos, por lo que el pH óptimo de producción está entre 1.7 y 2.0 (Betancourt, 2003).

Se observa que la concentración de ácido cítrico aumenta y a su vez los valores de pH disminuyen, lo que indica la producción de ácidos orgánicos en cada muestra (Bayona y col., 2009).

Tabla 6. Kit Enzimático Ácido Cítrico Megazyme®.

Muestra		PRIMERA Concentración (g/L)	DUPLICADO Concentración (g/L)	PROMEDIO Concentración (g/L)
Fruto completo	Cítrico 1	0.3040	0.3137	0.3089
	Cítrico 2	0.2757	0.3322	0.3040
	Cítrico 3	0.1032	0.1399	0.1216
	Cítrico 4	0.0326	0.0804	0.0565
Cáscara	Cítrico 1	0.1219	0.1382	0.1301
	Cítrico 2	0.1556	0.0939	0.1248
	Cítrico 3	0.1051	0.1389	0.1220
	Cítrico 4	0.0163	0.0151	0.0157
Semilla	Cítrico 1	0.1617	0.0635	0.1126
	Cítrico 3	0.0083	0.0914	0.0499
	Cítrico 4	0.0071	0.0731	0.0401

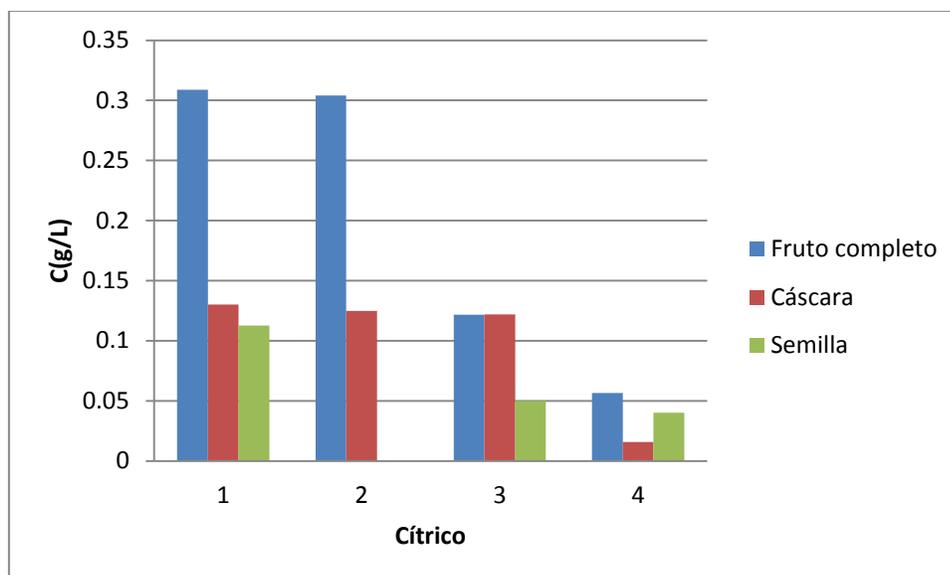


Gráfico 3. Ácido Cítrico.

5.4. Acidez total por titulación.

La determinación de la acidez de extractos cítricos se lleva a cabo mediante una valoración ácido-base; los resultados que se obtienen corresponden a la suma de los ácidos minerales y orgánicos, aunque de manera general en el caso de los frutos, se tratan de los ácidos cítrico, ascórbico, málico, oxálico y tartárico.

La acidez de los frutos se debe mayoritariamente a la concentración de ácido cítrico, que representa alrededor del 50% de la acidez total cuando la acidez de los frutos es máxima (Soler, 2009).

El cítrico 1 y cítrico 2 de fruto completo presento un mayor porcentaje de acidez, en comparación con los otros cítricos que presentaron un valor más bajo, la acidez de los zumos cambia, según la variedad y la maduración, entre límites muy amplios.

Tabla 7. Acidez Total.

Muestra		Mililitros de muestra	G (mililitros de NaOH)	Acidez Total g H ₂ SO ₄ /L	meq Ac. Cítrico g/L	ml NaOH/100ml
Fruto completo	Cítrico 1	0.05	0.69	67.62	88.3752	1380
	Cítrico 2	0.05	0.66	64.78	84.6736	1322.2
	Cítrico 3	0.05	0.07	6.62	8.6454	135
	Cítrico 4	0.05	0.08	7.51	9.8109	153.2
Cáscara	Cítrico 1	0.05	0.02	1.96	2.5616	40
	Cítrico 2	0.05	0.02	1.96	2.5616	40
	Cítrico 3	0.05	0.01	0.18	0.2305	3.6
	Cítrico 4	0.05	0.01	0.13	0.1665	2.6
Semilla	Cítrico 1	0.05	0.01	0.98	1.2808	20
	Cítrico 3	0.05	0.01	0.98	1.2808	20
	Cítrico 4	0.05	0.01	1.47	1.9212	30

Esto confirma el cálculo de ácido cítrico equivalente, ya que por cada gramo de ácido sulfúrico, tendríamos 1.307 gramos de ácido cítrico.

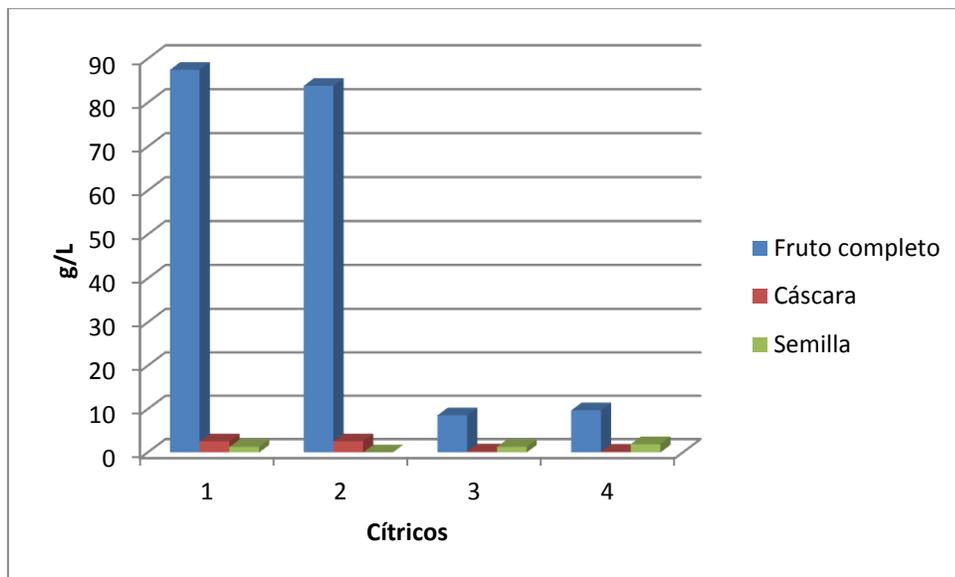


Gráfico 4. Acidez Total.

5.5. Actividad antimicrobiana de los extractos.

Tabla 8. Actividad antimicrobiana in vitro para bacterias, para los diferentes extractos.

Diámetro del halo de inhibición (mm)												
Muestras												
Bacteria		Fruto completo				Cáscara				Semilla		
		Cítrico 1	Cítrico 2	Cítrico 3	Cítrico 4	Cítrico 1	Cítrico 2	Cítrico 3	Cítrico 4	Cítrico 1	Cítrico 3	Cítrico 4
Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus.</i>	14	14	0	0	0	0	0	0	0	0	12
Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Bacillus subtilis.</i>	12	12	0	0,7	0	0	0	0	0	0	0,9
	<i>Escherichia coli.</i>	10	0,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 9. Actividad antimicrobiana in vitro para levaduras, para los diferentes extractos.

Diámetro del halo de inhibición (mm)											
Muestras											
Levadura	Fruto completo				Cáscara				Semilla		
	Cítrico 1	Cítrico 2	Cítrico 3	Cítrico 4	Cítrico 1	Cítrico 2	Cítrico 3	Cítrico 4	Cítrico 1	Cítrico 3	Cítrico 4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pichia pastoris</i>	12	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	14	10	0	0	0	0	0	0	13	0	0
<i>Candida utilis.</i>	0,9	0,8	0	0	0	0	0	0	14	15	10

Los resultados obtenidos mediante los antibiogramas para bacterias, los extractos del cítrico 1 y cítrico 2 presentaron mayor actividad antibacteriana frente a cepas bacterianas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* y menor actividad contra, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. El extracto cítrico 4, presentó mayor actividad antibacteriana frente a cepas bacterianas como *Bacillus subtilis* a partir del fruto completo.

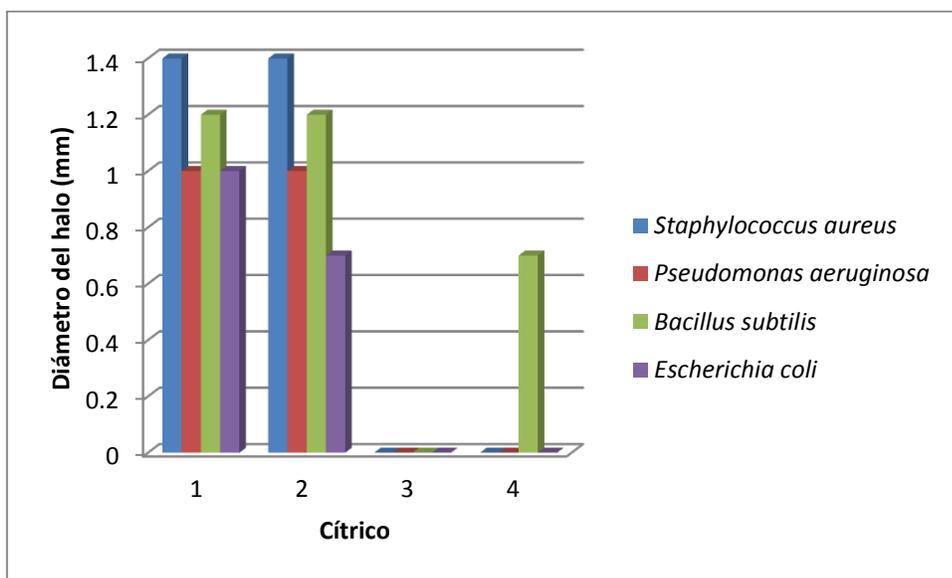


Gráfico 5. Diámetros de halos de inhibición para extractos de fruto completo en bacterias.



Figura 6. Halos de inhibición de discos con extractos de fruto completo, cítrico 1 y cítrico 2. (Trujillo, 2012).

El cítrico 4 presentó mayor actividad antibacteriana frente a cepas bacterianas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* a partir de semillas.

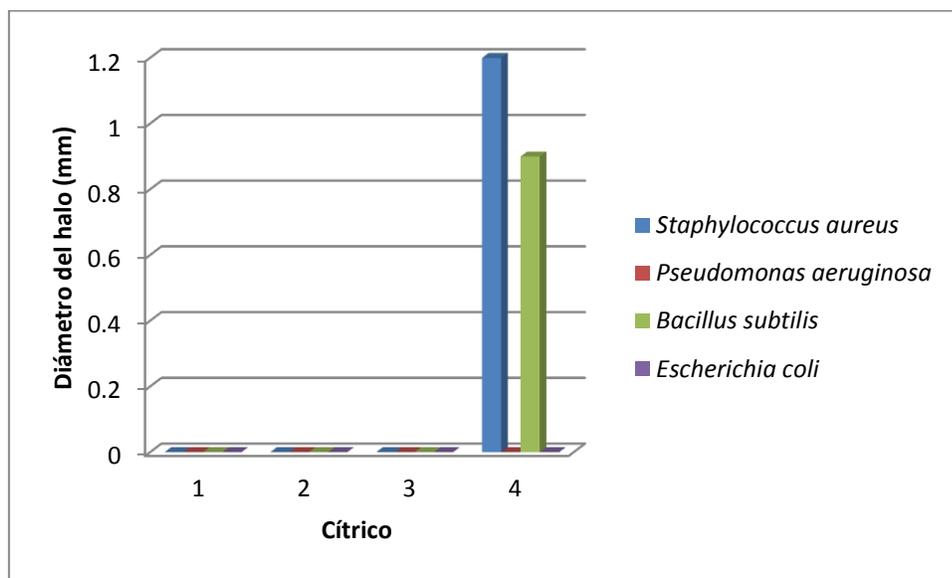


Gráfico 6. Diámetros de halos de inhibición para extractos de semillas en bacterias.



Figura 7. Halo de inhibición de discos con extractos de semilla de cítrico 4. (Trujillo, 2012).

En los resultados obtenidos mediante los antibiogramas para levaduras, los extractos del cítrico 1 y cítrico 2, presentaron mayor actividad antibacteriana frente a cepas bacterianas como *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y menor actividad contra *Candida utilis*, esto a partir de fruto completo.

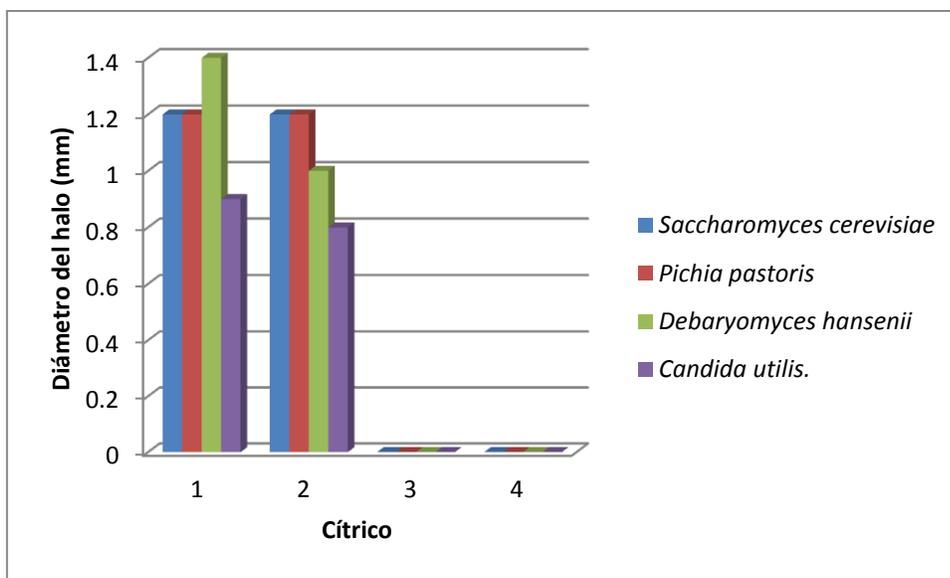


Gráfico 7. Diámetros de halos de inhibición para extractos de fruto completo en levaduras.



Figura 8. Halo de inhibición de discos con extractos de fruto completo, cítrico 1 y cítrico 2 en levaduras. (Trujillo, 2012).

El cítrico 1,3 y 4, presentó mayor actividad antibacteriana frente la levadura *Candida utilis* y el cítrico 1 frente la levadura *Debaryomyces hansenii*.

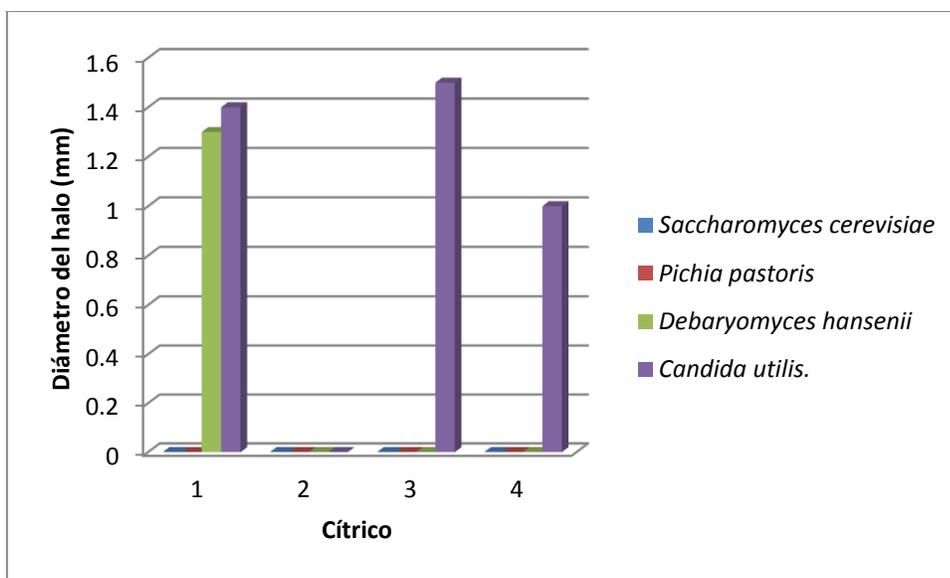


Gráfico 8. Diámetros de halos de inhibición para extractos de semillas en levaduras.

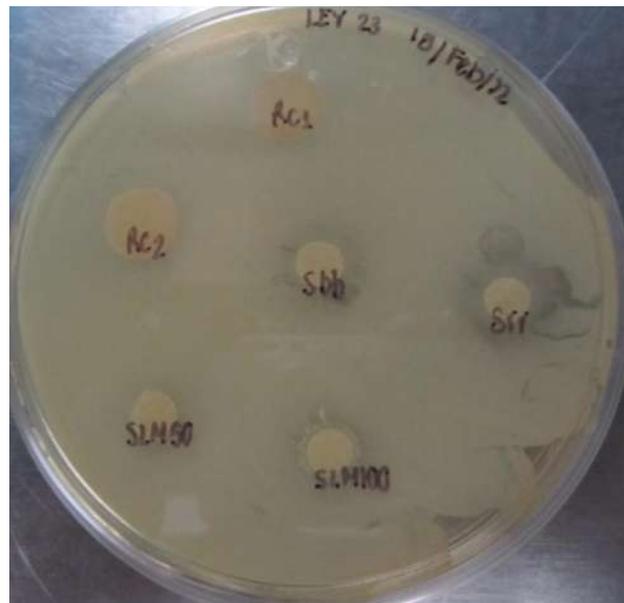


Figura 9. Halo de inhibición de discos con extracto de semilla cítrico 3. (Trujillo, 2012).

En el caso de los diferentes extractos cítricos a partir de la cáscara, tanto para bacterias como para levaduras se observó que no se presentó la formación de halos de inhibición alrededor del disco, no fueron inhibidas en su crecimiento por ningún extracto.



Figura 10. Halos de inhibición de discos con extractos de cáscara de los diferentes cítricos. (Trujillo, 2012).

5.6. Ácido Cítrico y Ácido Ascórbico HPLC.

Tabla 10. Curva de calibración Ácido Ascórbico.

Curva de calibración	Peso estándar (g)	Volumen inyectado (µL)	Factor de corrección de volumen	Concentración (g/L)	Tiempo de retención (min)	Área	Tipo de curva
1	0.0209	20	0.10	0.21	3.07	42.1	Bajas concentraciones
2	0.0209	30	0.15	0.31	3.09	58.0	
3	0.0209	40	0.20	0.42	3.11	69.0	
1	0.0209	10	0.50	1.05	3.08	115.0	Altas concentraciones
2	0.0209	20	1.00	2.09	3.09	139.1	
3	0.0209	30	1.50	3.14	3.11	151.6	
4	0.0209	40	2.00	4.18	3.11	161.0	

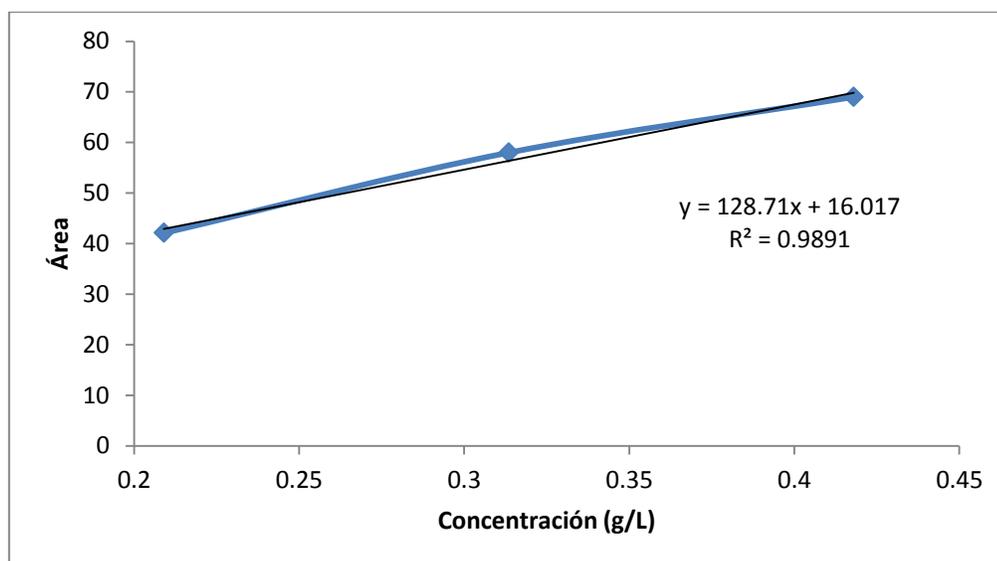


Gráfico 9. Curva de calibración Ácido Ascórbico a bajas concentraciones.

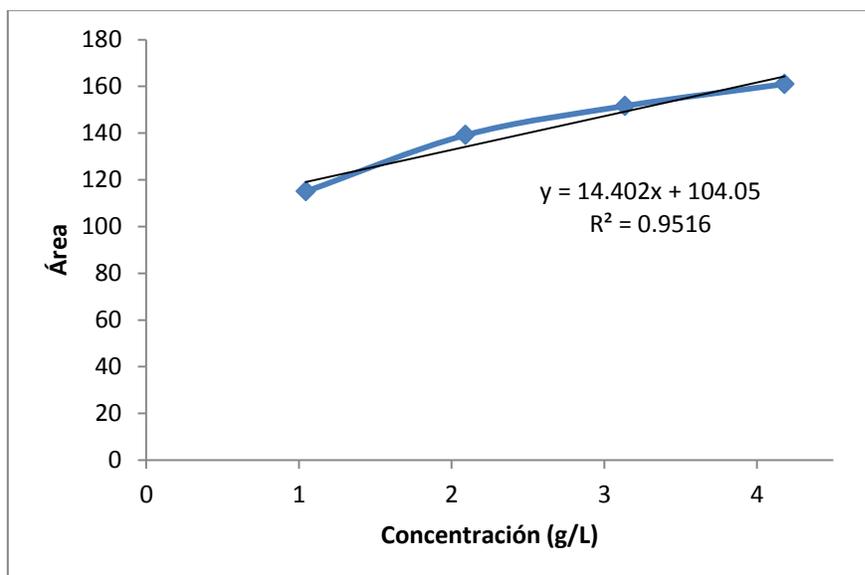


Gráfico 10. Curva de calibración Ácido Ascórbico a altas concentraciones.

Tabla 11. Curva de calibración Ácido Cítrico.

No. Estándar	Peso estándar (g)	Volumen inyectado (µL)	Factor de corrección de volumen	Concentración (g/L)	Tiempo de retención (min)	Área	Tipo de curva
1	0.0215	10	0.05	0.108	3.73	0.4	Bajas concentraciones
2	0.0215	20	0.10	0.215	3.76	3.0	
3	0.0215	30	0.15	0.323	3.77	4.5	
4	0.0215	40	0.20	0.430	3.79	5.8	
5	0.0215	10	0.50	1.075	3.84	14.6	Altas concentraciones
6	0.0215	20	1.00	2.150	3.87	29.7	
7	0.0215	30	1.50	3.225	3.91	42.8	
8	0.0215	40	2.00	4.300	3.89	56.8	

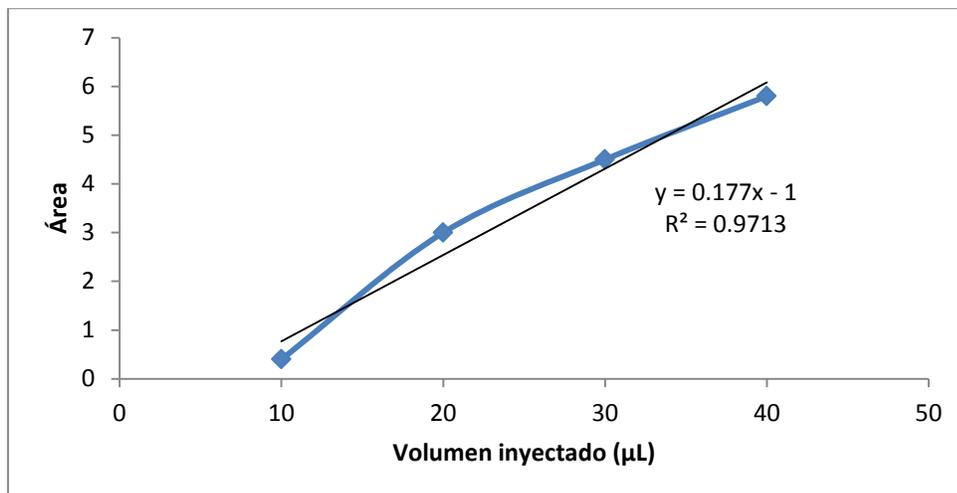


Gráfico 11. Curva de calibración Ácido Cítrico a bajas concentraciones.

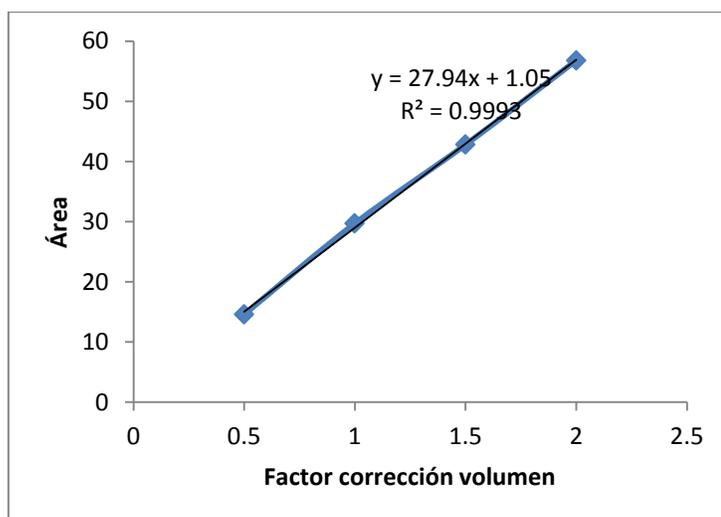


Gráfico 12. Curva calibración Ácido Cítrico a altas concentraciones.

Tabla 12 .Tiempo de retención y área de Ácido Ascórbico y Ácido Cítrico de los extractos por HPLC.

		Tiempo Retención		Área (mAU.Min)	
Fruto completo	Nombre Corrida	Ácido Ascórbico	Ácido Cítrico	Ácido Ascórbico	Ácido Cítrico
		Cítrico 1(0.3119g en 1 ml agua V40 µl)	3.17	3.99	28.4
	Cítrico 2 (0.3848 g en 1 ml agua V40 µl)	3.17	4.00	31.3	205.3
	Cítrico 3 (0.1033 g en 1 ml agua V40 µl)	3.16	4.03	21.1	27.5
	Cítrico 4 (0.0722 g en 1ml agua V40µl)	3.15	4.07	32.0	79.3
Cáscara	Cítrico 1 (0.3039g 1 ml agua V40 µl)	3.01	3.85	2.6	6.3
	Cítrico 2 (0.3089 g en 1 ml agua V40 µl)	3.15	4.04	1.1	58.7
	Cítrico 3 (0.1019 g en 1 ml agua V40 µl)	3.20	4.19	0.4	18.6
	Cítrico 4 (0.0993 g en 1 ml agua V40 µl)	3.31	4.13	2.4	2.3
Semilla	Cítrico 1 (0.0989 g 1 ml de agua V40 µl)	3.17	4.00	0.9	0.6
	Cítrico 3 (0.3099 g en 1 ml agua V40 µl)	3.27	3.90	1.5	0.6
	Cítrico 4 (0.3062 g en 1 ml de agua V40 µl)	3.13	3.81	16.5	14.0

De acuerdo a los resultados obtenidos, observamos que los cítricos de fruto completo tienen un mayor porcentaje de ácido cítrico en comparación con los de cáscara y semilla que fue muy poco, sobresaliendo el cítrico 4 y después el cítrico 1.

Tabla 13. Análisis de Ácido Cítrico en extractos por HPLC.

Nombre de la muestra		Concentración según la curva g/L	Concentración g/100 g (%) ácido cítrico	Tiempo de retención (min)
Fruto completo	Cítrico 1	16.7380	0.215	3.99
	Cítrico 2	15.4311	0.160	4.00
	Cítrico 3	2.0767	0.080	4.03
	Cítrico 4	5.9674	0.331	4.07
Cáscara	Cítrico 1	0.4844	0.006	3.85
	Cítrico 2	4.4201	0.057	4.04
	Cítrico 3	1.4083	0.055	4.19
	Cítrico 4	0.1840	0.007	4.13
Semilla	Cítrico 1	0.0563	0.002	4.00
	Cítrico 3	0.0563	0.001	3.90
	Cítrico 4	1.0628	0.014	3.81

En el caso del ácido ascórbico de acuerdo a la siguiente tabla, se puede observar que se obtuvieron resultados para los cítricos de fruto completo, pero en valores de concentración muy bajos y para cáscara y semilla se determinará el límite de cuantificación para reportar < LC.

Tabla 14. Análisis de Ácido Ascórbico en extractos por HPLC.

Nombre de la muestra		Concentración según la curva g/L	Concentración g/100 g (%) ácido ascórbico	Tiempo de retención (min)
Fruto completo	Cítrico 1	0.0962	0.001	3.17
	Cítrico 2	0.1187	0.001	3.17
	Cítrico 3	0.0395	0.002	3.16
	Cítrico 4	0.1242	0.007	3.15
Cáscara	Cítrico 1	ND	ND	3.01
	Cítrico 2	ND	ND	3.15
	Cítrico 3	ND	ND	3.20
	Cítrico 4	ND	ND	3.31
Semilla	Cítrico 1	ND	ND	3.17
	Cítrico 3	ND	ND	3.27
	Cítrico 4	ND	ND	3.13

5.7. Espectros de absorción en el espectrómetro de infrarrojo.

En la siguiente tabla encontramos el intervalo de frecuencias que sirvieron para identificar algunos compuestos presentes en los extractos de los diferentes cítricos.

Tabla 15. Tabla abreviada de las frecuencias de grupo de grupos orgánicos.

(Skoog y col., 2008)

Enlace	Tipo de compuesto	Intervalo de frecuencias, cm^{-1}	Intensidad
C-H	Alcanos	2.850-2.970	Fuerte
		1.34-1.470	Fuerte
C-H	Alquenos	3.010-3.095	Media
		675-995	Fuerte
C-H	Alquinos	330	Fuerte
C-H	Anillos aromáticos	3.010-3.100	Media
		690-900	Fuerte
O-H	Alcoholes y Fenoles (monómeros)	3.590-3.650	Variable
	Alcoholes y Fenoles (unidos por puentes de hidrógeno)	3.200-3.600	Variable, a veces ancha
	Ácidos carboxílicos (monómeros)	3.500-3.650	Media
	Ácidos carboxílicos (unidos por puentes de hidrógeno)	2.500-2.700	Ancha
N-H	Aminas, amidas	3.300-3.500	Media
C=C	Alquenos	1.610-1.680	Variable
C=C	Anillos aromáticos	1.500-1.600	Variable
C≡C	Alquinos	2.100-2.260	Variable
C-N	Aminas, amidas	1.180-1.360	Fuerte
C≡N	Nitrilos	2.210-2.280	Fuerte
C-O	Alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, ésteres	1.050-1.300	Fuerte
C=O	Aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres	1.690-1.760	Fuerte
NO ₂	Nitroderivados	1.500-1.570	Fuerte
		1.300-1.370	Fuerte

Para el cítrico 1 y 2 se encontraron alquenos (1.610-1.680) con bandas de intensidad variable; aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres (1.690-1.760) con bandas de intensidad fuerte; alcanos (2.850-2.90) con bandas de intensidad fuerte; aminas, amidas (3.300-3.500) con bandas de intensidad media; ácidos carboxílicos (monómeros) (3.500-3.650) con bandas de intensidad media; alcoholes y fenoles (monómeros) (3.590-3.650) con bandas de intensidad variable.

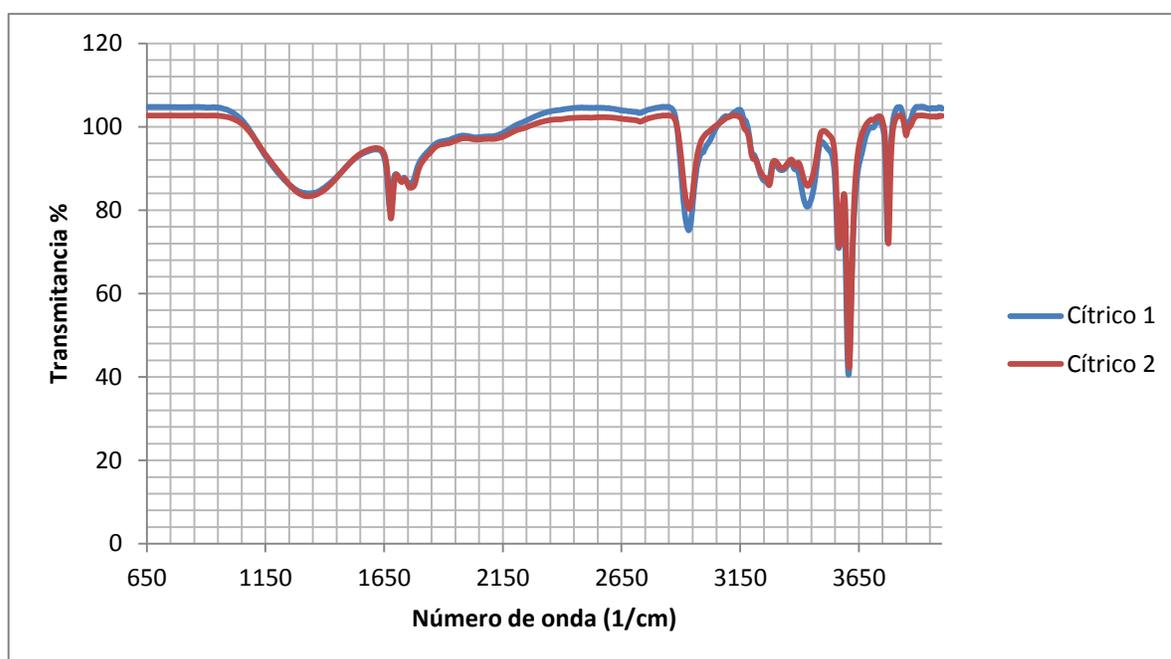


Figura 11. Identificación de compuestos antimicrobianos en extractos de fruto completo, cítrico 1 y 2.

Para el cítrico 3 y 4 se encontraron alcanos (2.850- 2.90) con bandas de intensidad fuerte; anillos aromáticos (3.010-3.100) con bandas de intensidad media; aminas, amidas (3.300-3.500) con bandas de intensidad media; ácidos carboxílicos (monómeros) (3.500-3.650) con bandas de intensidad media.

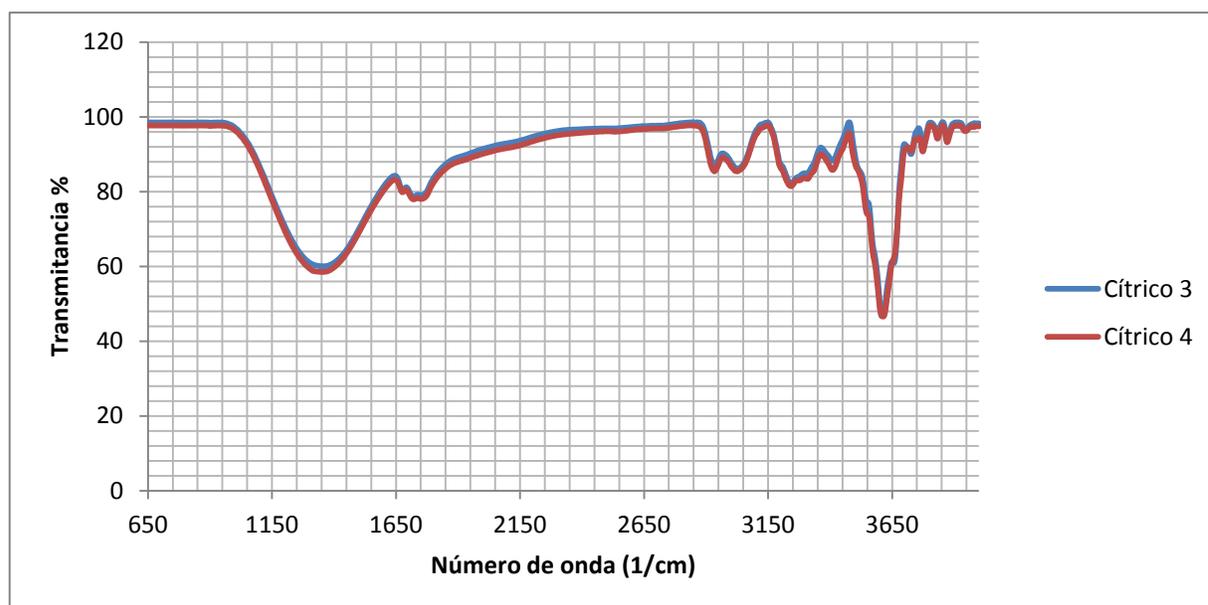


Figura 12. Identificación de compuestos antimicrobianos en extractos de fruto completo, cítrico 3 y 4.

Para el cítrico 1 se encontraron alquenos (1.610-1.680) con bandas de intensidad variable; alcanos (2.850-2.90) con bandas de intensidad fuerte; alcoholes y fenoles (unidos por puentes de hidrógeno) con bandas de intensidad variable; aminas, amidas (3.300-3.500) con bandas de intensidad media; alcoholes y fenoles (monómeros) (3.590-3.650) con bandas de intensidad variable. En el caso del cítrico 2 se encontraron alquenos (1.610-1.680) con bandas de intensidad variable; aminas, amidas (3.300-3.500) con bandas de intensidad media; ácidos carboxílicos (monómeros) (3.500-3.650) con bandas de intensidad media, alcoholes y fenoles (monómeros) (3.590-3.650) con bandas de intensidad variable.

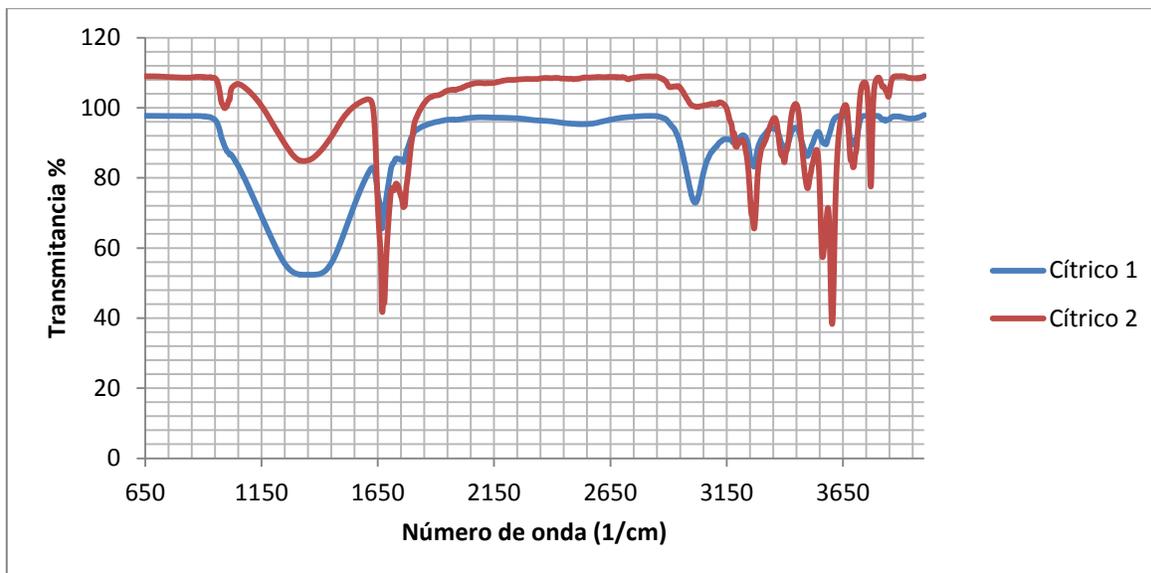


Figura 13. Identificación de compuestos antimicrobianos en extractos de cáscara, Cítrico 1 y 2.

Para el cítrico 3 y 4 se encontraron aldehídos, cetonas, ésteres (1.690-1.760) con bandas de intensidad fuerte; ácidos carboxílicos (monómeros) (3.500-3.650) con bandas de intensidad media; alcoholes y fenoles (monómeros) (3.590-3.650) con bandas de intensidad variable.

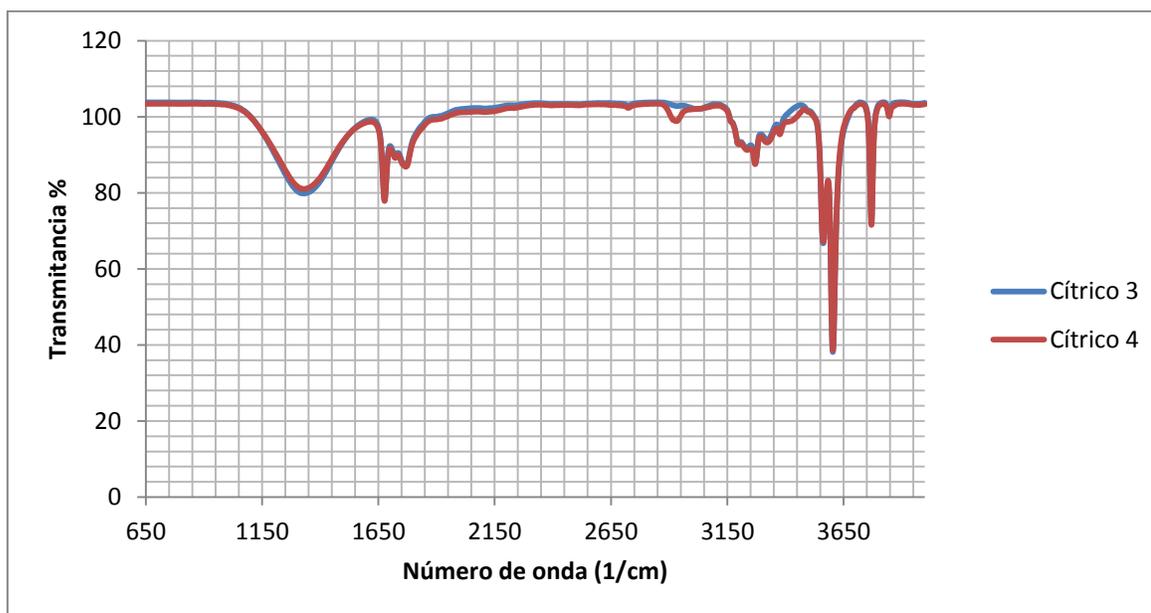


Figura 14. Identificación de compuestos antimicrobianos en extractos de cáscara, Cítrico 3 y 4.

Para las semillas de los cítricos 1, 3, 4 se encontraron aldehídos, cetonas, ésteres (1.690-1.760) con bandas de intensidad fuerte; ácidos carboxílicos (monómeros) (3.500-3.650) con bandas de intensidad media; alcoholes y fenoles (monómeros) (3.590-3.650) con bandas de intensidad variable.

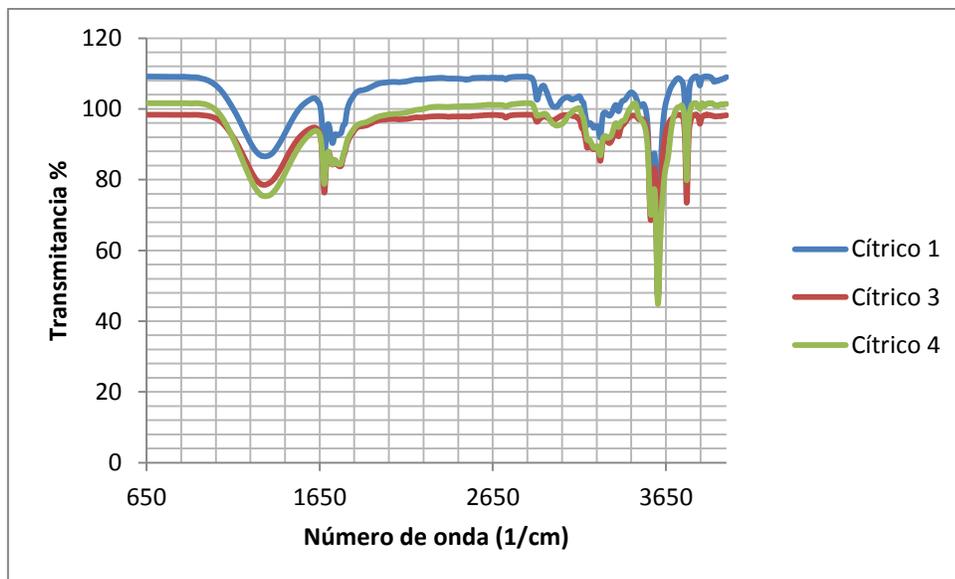


Figura 15. Identificación de compuestos antimicrobianos en extractos de semilla, cítrico 1,3 y 4.

5.8. Cromatogramas.

La cromatografía de gases es útil para gases o para compuestos relativamente volátiles, lo que incluye a numerosos compuestos orgánicos.

La concentración de las sustancias se obtiene en gráficas representadas mediante picos y se compara con un patrón de referencia. La cuantificación se podría hacer directamente de la siguiente manera:

- A través de la altura de los picos.
- Del área de las curvas (lo más utilizado).

En las figuras 16 a la 29, se muestran los cromatogramas obtenidos para los extractos estudiados de las diferentes partes del cítrico (fruto completo, cáscara y semilla).

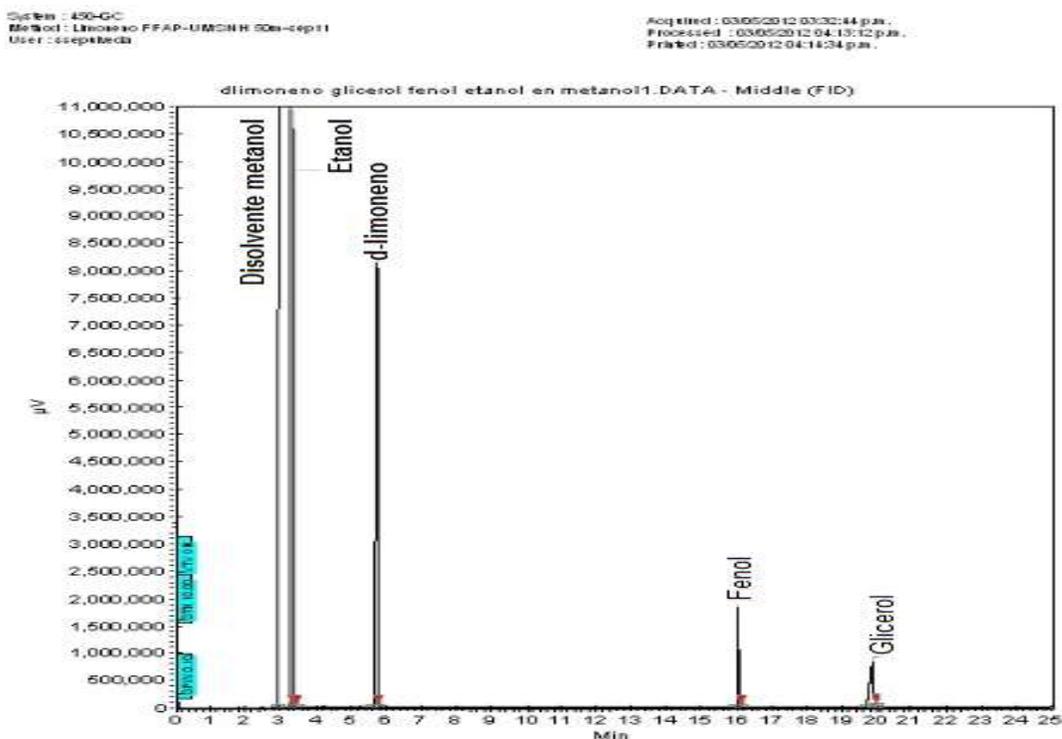


Figura16. Cromatograma de estándares inyectados.

En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos por cromatografía de gases para algunos de los estándares analizados.

Tabla 16. Estándares analizados por Cromatografía de gases.

Nombre	Tiempo(min)	Cantidad % Área	Elevación ($\mu\cdot V$)	Área ($\mu\cdot V\cdot Min$)	Área %
Disolvente Metanol	3.23	89.76	33982584.9	7279106.6	89.755
Etanol	3.39	2.74	9768044.3	222415.6	2.743
d- limoneno	5.74	5.6	8175027.5	454056.9	5.599
Fenol	16.04	0.76	1829583.9	61664	0.76

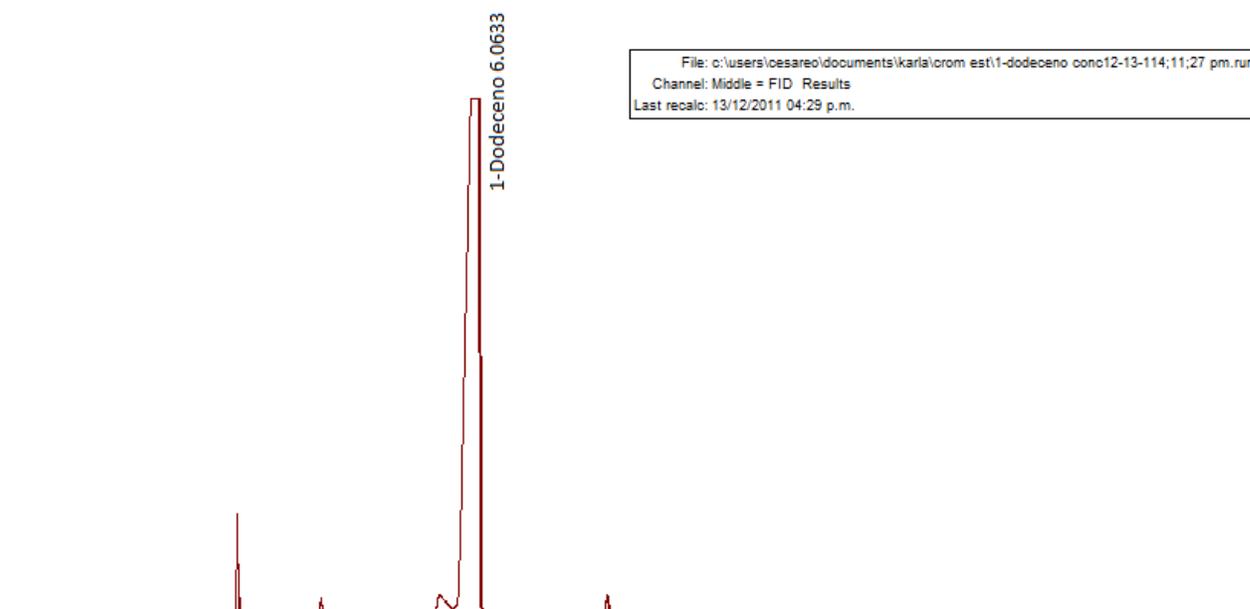


Figura 17. Cromatograma 1-Dodeceno.

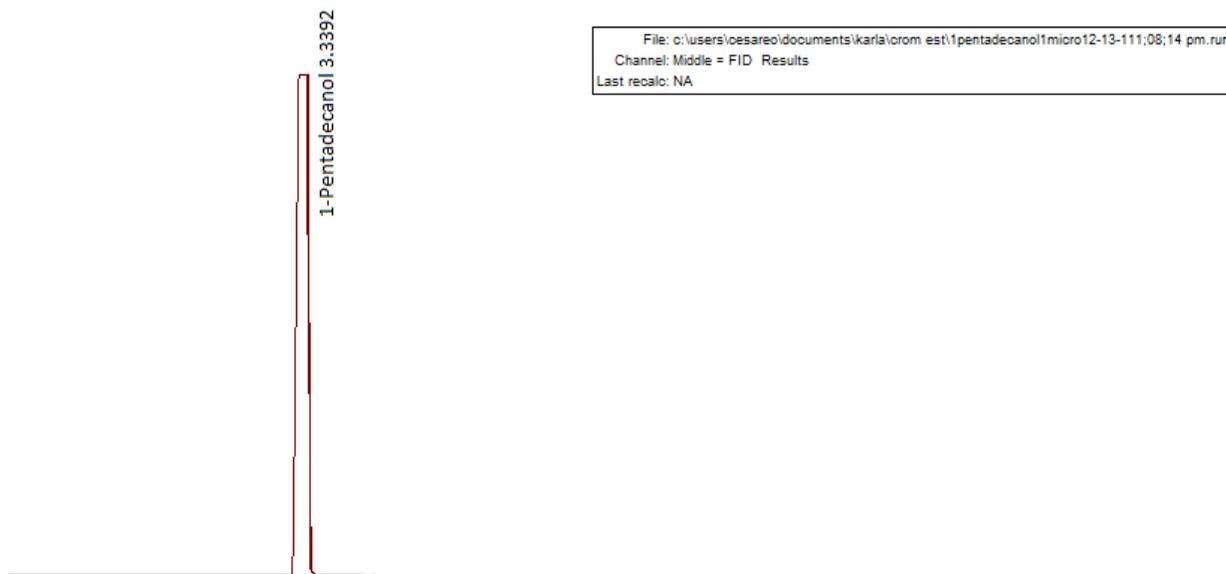


Figura 18. Cromatograma 1-Pentadecanol.

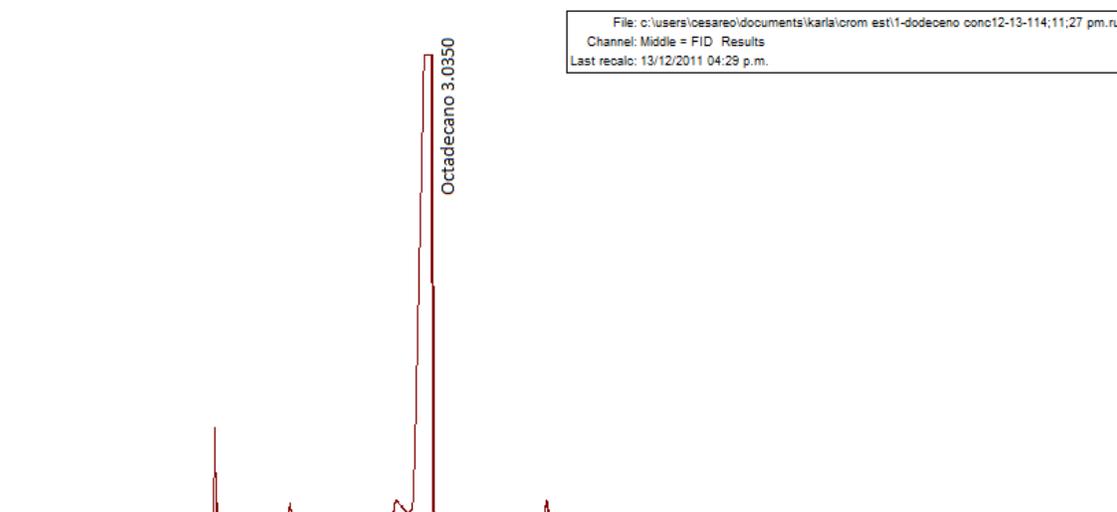


Figura 19. Cromatograma Octadecano.

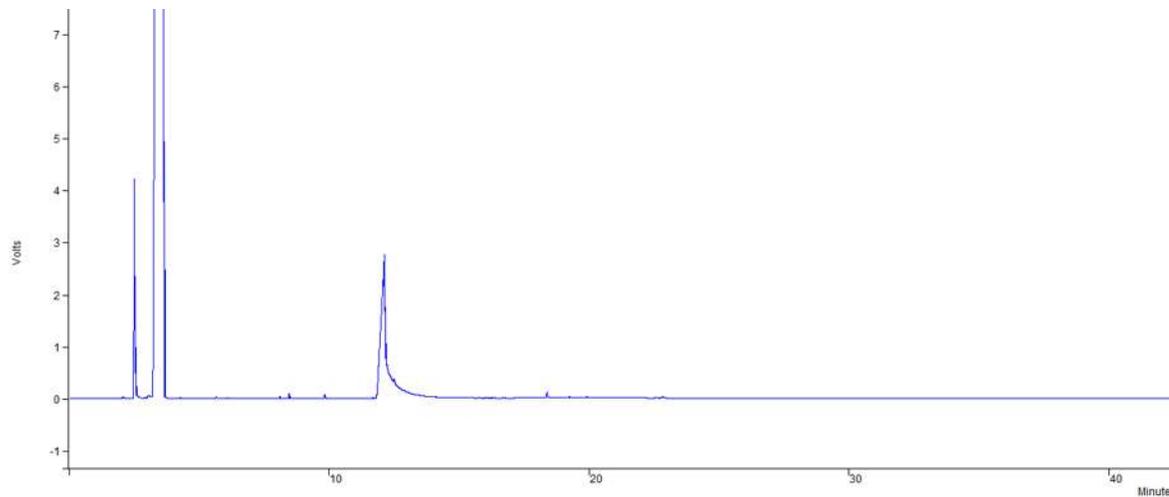


Figura 20. Cromatograma Cítrico 1, Fruto completo: octadecano, fenol, d-limoneno, 1-Dodeceno

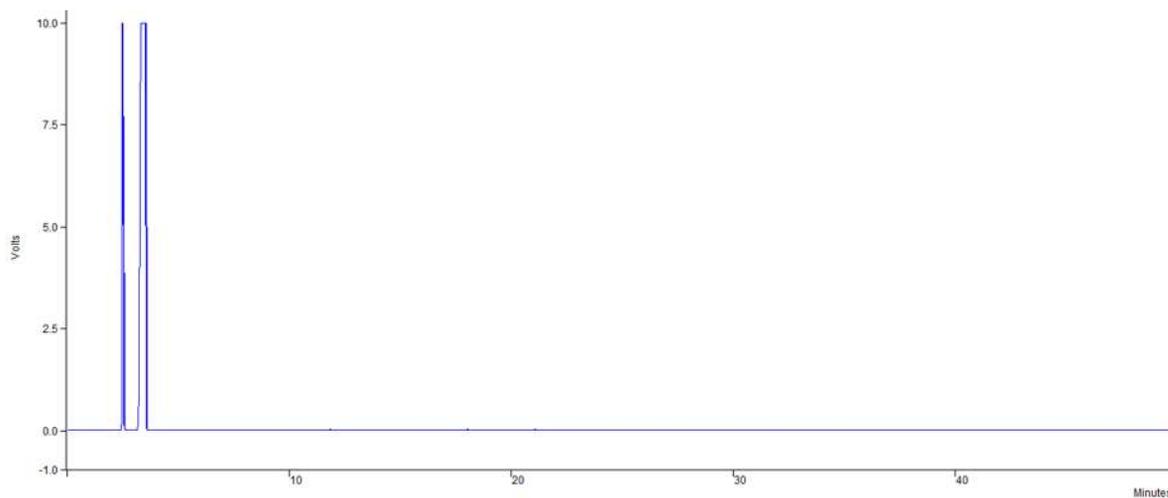


Figura 21. Cromatograma Cítrico 2, Fruto Completo: etanol y fenol.

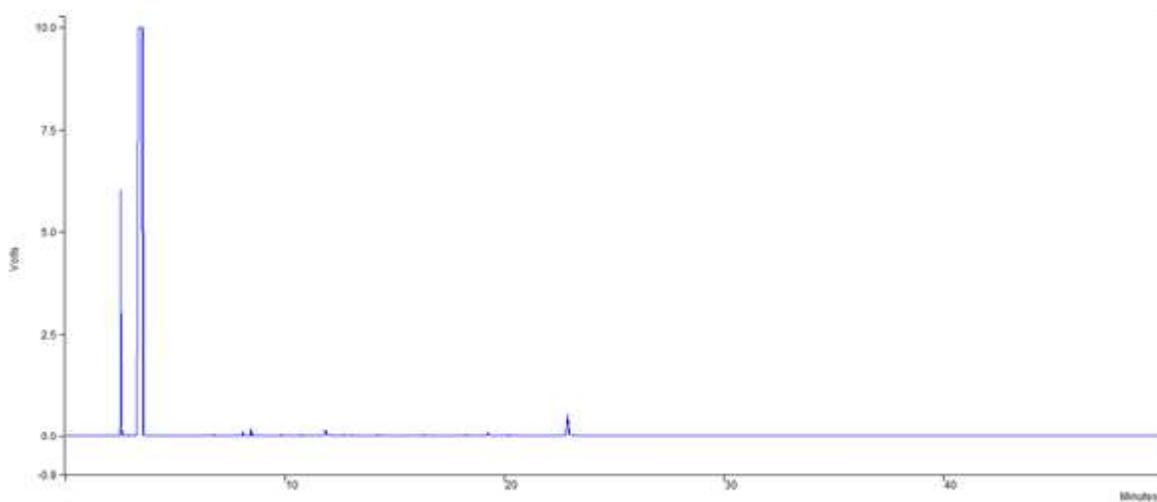


Figura 22. Cromatograma Cítrico 3, Fruto completo: etanol y fenol.

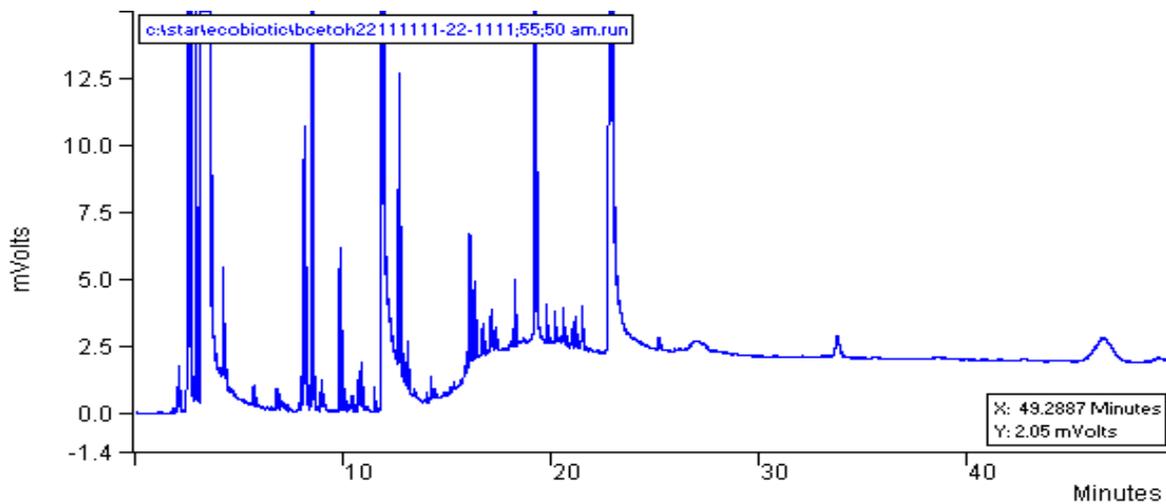


Figura 23. Cromatograma Cítrico 4, Fruto completo: etanol, d-limoneno, fenol.

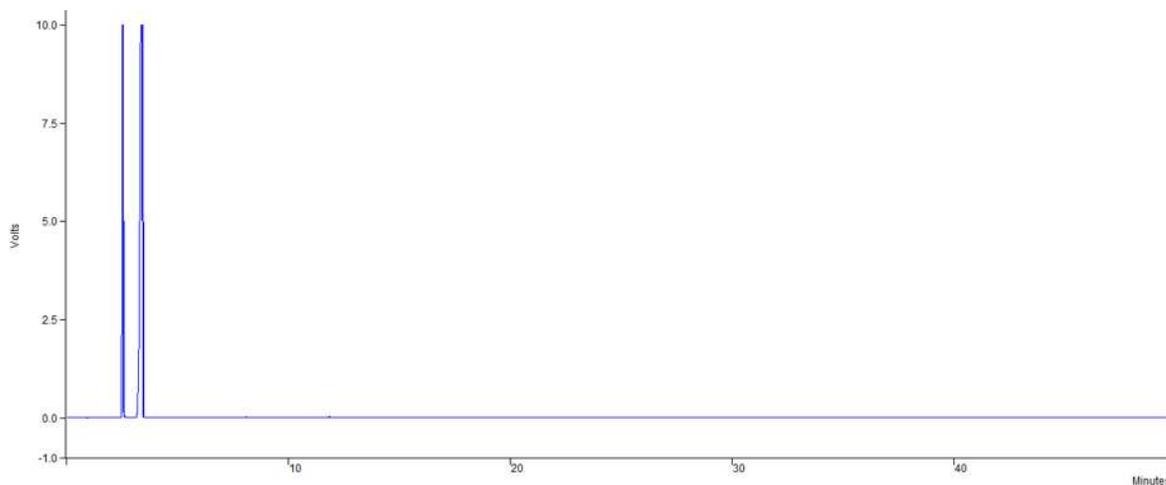


Figura 24. Cromatograma Cítrico 1, Cáscara: etanol.

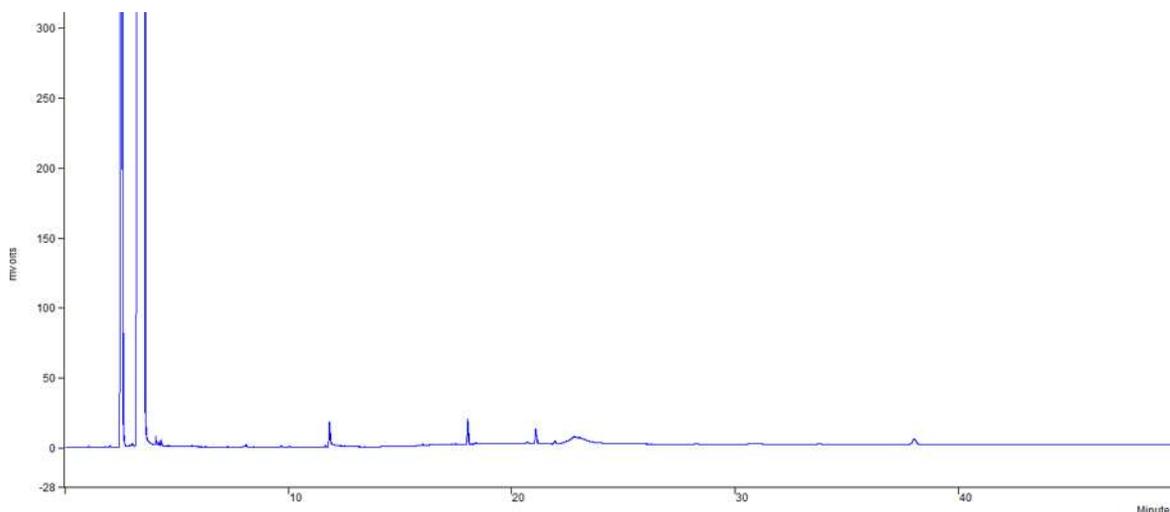


Figura 25. Cromatograma Cítrico 2, Cáscara: etanol y fenol.

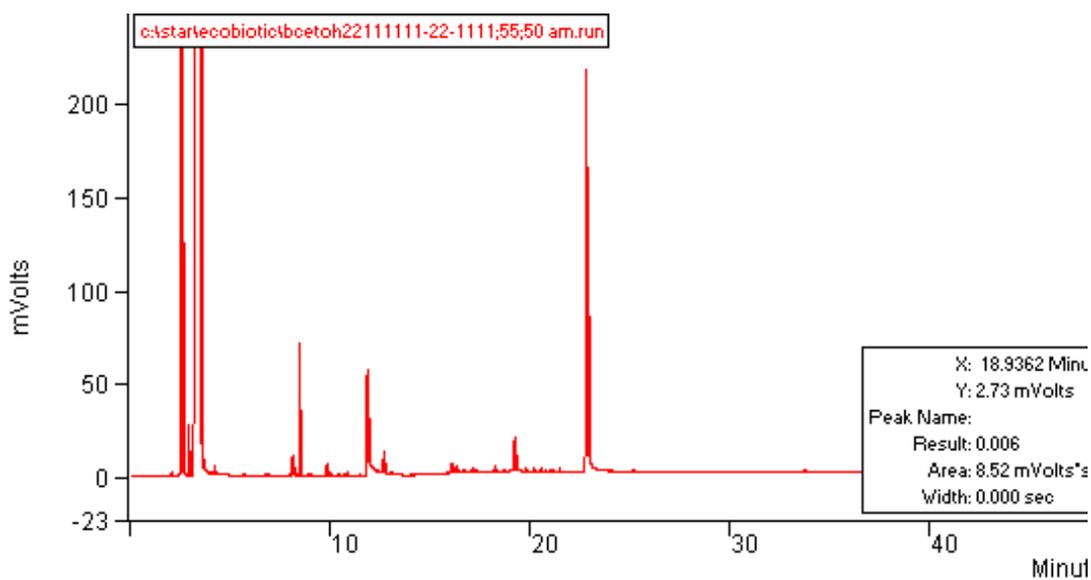


Figura 26. Cromatograma Cítrico 3, Cáscara: etanol y fenol.

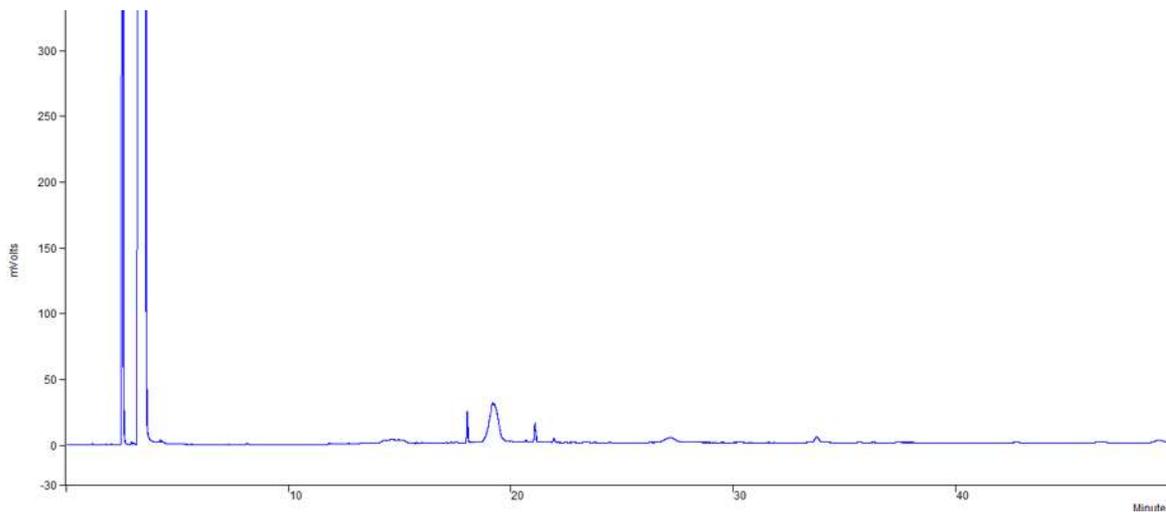


Figura 27. Cromatograma Cítrico 1, Semilla: etanol.

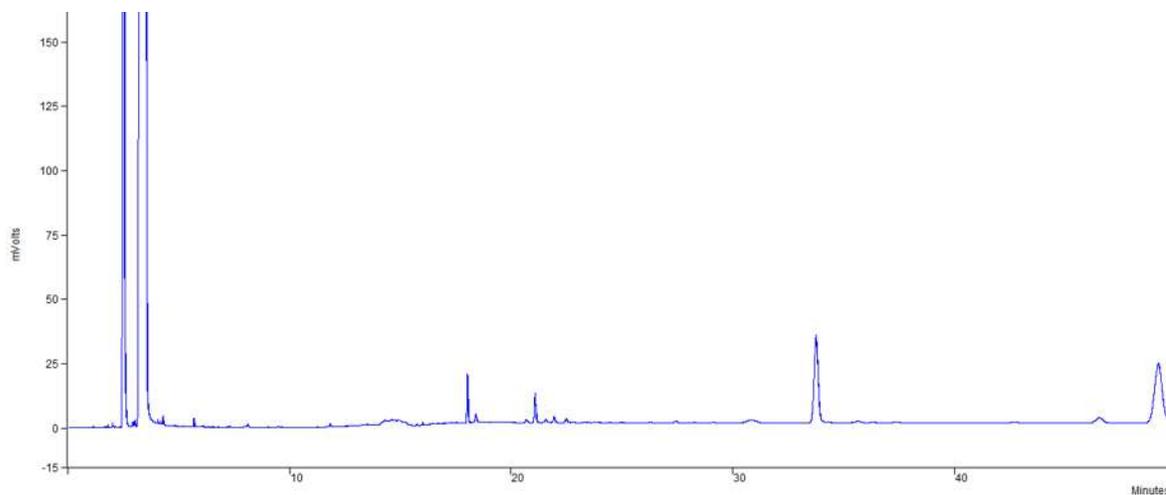


Figura 28. Cromatograma Cítrico 3, Semilla: etanol, d-limoneno, fenol.

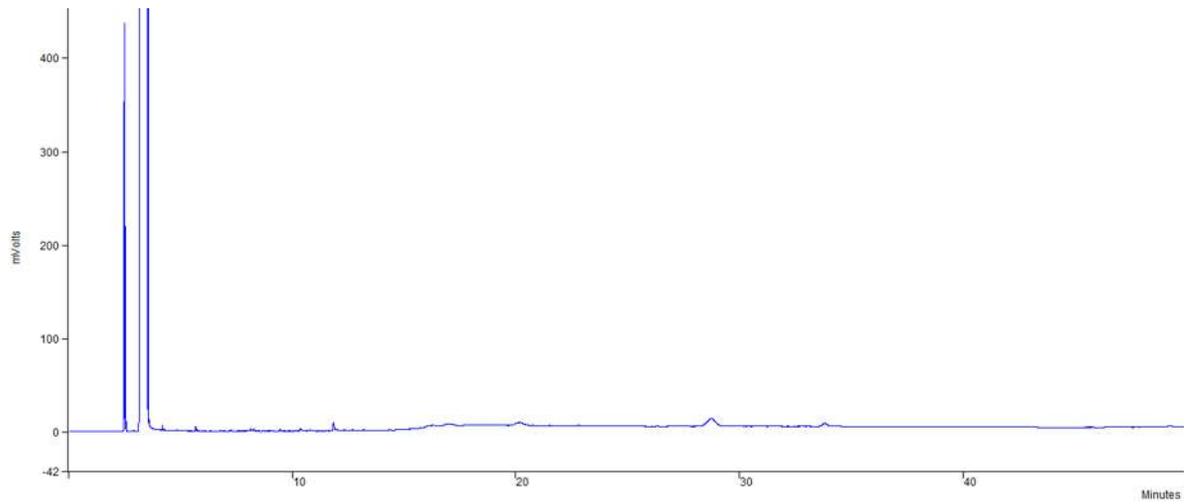


Figura 29. Cromatograma Cítrico 4, Semilla: etanol y fenol.

DISCUSIONES.

En los resultados para la determinación de pH, observamos que el cítrico 1 y cítrico 2 tienen un valor de pH más bajo lo que los hace más ácidos, esto favorece la presencia de ácidos orgánicos.

En las pruebas de ácido cítrico se puede comprobar que los cítricos de fruto completo contiene una mayor cantidad de ácido, en especial el cítrico 1 y cítrico 2 mediante la prueba del kit enzimático para la identificación de ácido cítrico Megazyme® y por cromatografía líquida de alta resolución este último con valores más altos, esto debido a que muestra niveles de resolución y sensibilidad mayor. Es importante considerar que depende mucho del método utilizado, tomando en cuenta las condiciones como el peso de la muestra, volumen de muestra inyectado y volumen de aforo.

Para la cuantificación de ácido ascórbico, se observaron valores altos en el cítrico 3 y cítrico 4 de fruto completo mediante la determinación de ácido ascórbico por método de titulación, en comparación con la cromatografía líquida de alta resolución que los valores fueron menores. Es importante considerar que depende del método utilizado, tomando en cuenta las condiciones como el peso de la muestra, volumen de muestra inyectado y volumen de aforo.

Se observa que existe una razón inversa entre ambos entre los cítricos 1 y 2 y los cítricos 3 y 4, es decir, que según los resultados obtenidos, las frutas más ácidas son las que tienen menor cantidad de vitamina C. Esta observación contradice hasta cierto punto, la creencia muy generalizada de que el ácido ascórbico está en razón directa con la cantidad de ácido cítrico en el jugo. No deja de ser curioso también que, aun con esta fuerte corriente a favor de las frutas ácidas, las personas prefieran el cítrico dulce desde hace mucho tiempo como “medicinal” al cítrico agrio. Este trabajo viene a demostrar que algún fundamento había para tal opinión.

Respecto a los ensayos realizados de halos de inhibición y comprobando nuestro objetivo principal se obtuvo que el cítrico 1 y cítrico 2 de fruto completo, presentaron mayores

diámetros de inhibición en bacterias gram positivas y gram negativas, del mismo modo que para las levaduras propuestas. El cítrico 1,3 y 4 de semillas, se obtuvieron datos representativos en *Candida Utilis*. En cuanto al cítrico 4 de semillas resultados favorables para *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

Los cromatogramas (figuras 16-29) y los espectros (figuras 11-15) obtenidos por infrarrojo, respaldan la existencia de compuestos antimicrobianos como: etanol y fenol, debido a las señales obtenidas, que corresponden a la estructura química de estos compuestos.

CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo permitió establecer las siguientes conclusiones:

- De los extractos de cítricos estudiados se concluye que, los cítricos 1 y 2 en fruto completo, al presentar valores de pH bajos, favorecen la presencia de ácidos orgánicos como el ácido cítrico y ácido ascórbico que tienen propiedades microbicidas, mostrando mayor resistencia en cuatro tipos diferentes de bacterias y levaduras (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichias pastoris*, *Candida utilis*)
- Los cítricos más ácidos son los que tienen menor cantidad de ácido ascórbico, como el cítrico 3 y cítrico 4, debido probablemente a la variedad del cítrico.
- Los cromatogramas y los espectros obtenidos por infrarrojo, permitieron determinar la presencia de compuestos antimicrobianos como: fenol, etanol, d-limoneno, ácido cítrico y ácido ascórbico.
- Al utilizar la extracción por prensado representa un costo relativamente bajo, que se caracteriza por un bajo consumo energético, ayudando a conservar los ácidos grasos esenciales, vitamina E, antioxidantes naturales y además no se requiere ningún aditivo o disolvente.

RECOMENDACIONES.

- Una vez realizadas las extracciones por prensado (en frío) de las diferentes partes del cítrico, hacer las pruebas a la brevedad posible para evitar la pérdida de propiedades y mantener en refrigeración (congelación).
- Realizar extracciones a diferentes condiciones de temperatura y probar el uso de diferentes solventes.
- Realizar estudios de análisis y caracterización de extractos cítricos por cromatografía de líquidos de otros componentes encontrados en los extractos de cítricos obtenidos.

VALIDACIÓN DE LA HIPÓTESIS Y CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS.

El uso de la extracción de los compuestos de interés por prensado, del fruto entero, de la semilla y finalmente de la cáscara permitirá la separación, así como conservar la funcionalidad de los principios activos presentes en los cítricos a estudiar, lo que permitirá tener pruebas de actividad bactericida y microbicida más eficientes. De los resultados obtenidos con el presente trabajo se valida la hipótesis planteada y la presencia de compuestos antimicrobianos es satisfactoria, ya que los diámetros de zona de inhibición inferiores a 15 mm son los que presentan las cepas utilizadas en este estudio.

Los objetivos planteados para la realización del presente estudio se cumplieron satisfactoriamente.

REFERENCIAS.

1. Aceite esencial. (s.f.). Consulta del 1 marzo, 2012, de http://es.wikipedia.org/wiki/Aceite_esencial.
2. Albrigo L y Devices F.1999. Cítricos Editorial ACRIBIA Zaragoza. España.
3. Almanza Gaviña Carlos Javier. 2009. El negocio del limón en Michoacán. El economista. México, D.F.
4. Alonso P. Olimpia. 2011. Extracción e identificación de compuestos antimicrobianos en cítricos. Memorias de residencias Instituto Tecnológico de Morelia.
5. Amsterdam D. 1996. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. Antibiotics in laboratory medicine (4a edición).
6. Antimicrobiano Generalidades. (s.f.). Consulta del 1 marzo, 2012, de <http://www.microbiologia.com.ar/antimicrobianos/general.php>
7. Araujo, D. 2000. Análisis Cromatográfico del aceite esencial de mandarina variedad Dancy/Citrus reticulate Blanco). Trabajo especial de Grado. Facultad Experimental de Ciencias. Maracaibo, Venezuela.
8. Bayona María Cecilia; Roldan Juan Camilo; Torres Mabel Milena. 2009. Evaluación de producción de ácido cítrico empleando almidón de papa. Universidad pontificia Bolivariana. Facultad de Ingeniería Química. Colombia.
9. Betancourt Garcés Adriana Lorenza. 2003. Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación en un cultivo líquido. Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería y Arquitectura.

10. Calderón J. Ernesto. 2000. Aplicación Clínica de Antibióticos y Quimioterapéuticos. Méndez editores, S.A de C.V. México.
11. Carriedo G. Karla Guadalupe, Cazarez A. Olivia, García A. Ma. E. Valentina, Piñon Ch. Alma Edith, Ruiz F. Silvia María. 2011. Desarrollo de Extracto Cítrico Microbicida y/o Bactericida de Alto espectro. Memorias de residencias Instituto Tecnológico de Morelia.
12. Castañeda ML, Muñoz A, Martínez JR, Stashenko E. 2007. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Técnica*; XIII (003):165-166.
13. Copping LG, Duke SO. 2007. Natural products that have been used commercially as crop protection agents, *Pests Manag Sci*; 63:524-554.
14. Dabbah, R., V.M. Edwards y W.A. Motas. 1970. Antimicrobial Activity of Some Citrus Fruits Oils on Selected Food-Borne Bacteria. *Appl. Microbiology*. 19 (1):27-31.
15. Gerdensen P.M, León Yáñez S. 1999. Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Missouri Botanical Garden Press, p. 1181.
16. Gil EP, Sáez AV. Evaluación a escala de planta piloto del proceso industrial para la obtención de aceite de cárdamo, bajo la filosofía cero emisiones. Universidad EAFIT. 2005. (Consulta: 5 jul 2008). Disponible en www.eafit.edu.co/NR/rdonlyres/E5DAC709-C033-4BBF-8939-78683B9 EC5C0/0/Cuaderno30.pdf.
17. Hersom, A.C y E.D. Hulland. 1974. Conservas Alimenticias. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. pp.61-62.
18. ICMSF. 1990. Ecología microbiana de los Alimentos Vol II, Acriba. Zaragoza.
19. Los cítricos. (s.f.). Consulta del 1 marzo, 2012, de <http://www.botanical-online.com/citricos.htm>

20. Martínez, B. Sulbarán de Ferrer, G. Ojeda de Rodríguez, A. Ferrer y R. Nava. 2003. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. Rev. Fac. Argon. v.20 n.4 Caracas.
21. Machado L. Anabel, Moreno D. Andrea, Olivo T. Jenifer, Ruiz F. Silvia María. 2012. Identificación y evaluación del efecto microbicida de metabolitos obtenidos de cítricos. Memorias Instituto Tecnológico de Morelia.
22. Mollering, H. 1989. Citrate. In Methods of Enzymatic Analysis (Bermeyer, H. U.), 3rd ed., Vol. VII, pp. 2-12, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.
23. Morales de Godoy, V. 1996. Extracción y Caracterización del aceite esencial de Lima Thaití *Citrus aurantiifolia* (Chritms) Swingle. Trabajo especial de Grado. LUZ. Facultad Experimental de Ciencias, Maracaibo, Venezuela. pp. 18-19.
24. O. Cartaya e Ines Reynaldo. 2001. Flavonoides: Características Químicas y Aplicaciones. Cultivos Tropicales, vol. 22, no.2, pp.5-14.
25. Pal S, Tak Yk, Song Jm. 2007. Does the antimicrobial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram – negative bacterium *Escherichia coli*. Appl Environ Microciol. 73:1712-20.
26. Panacek Ales, Kvýtek Libor, Pucek Robert, Kolar Milan, Vecerova Renata, Pizurova Nadezda, Virender, K. Sharma, Tatčjana Nevecna and Radek Zboril. 2006. Silver Colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. J Phys Chem B. 110:16248-53.
27. Ramirez A. Luz S, Diaz B Hilda. 2007. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). Scientia et Technica Año XIII, No 33.

28. Raybaudi-Massilia, R. M., Soliva Fortuny, R., Martín Belloso, O. 2006. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas. Simposio Ibero-Americano de Vegetais Frescos Cortados, San Pedro, SP Brazil.
29. Roque A. Hours, María M. Ferreyra, María del C. Schvad, Liliana M. Gerard, Luz M. Zapata, Cristina V. Davies. Caracterización Fisicoquímica y Microbiológica de jugos de naranja destinados a vinificación. Ciencia y Tecnología, noviembre, año/vol. XV1, número 031, Universidad Nacional de Entre Ríos. Concepción del Uruguay, Argentina. Pp. 219-239.
30. Sánchez C. Francisco J. 2006. Extracción de aceites esenciales. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.
31. Sánchez Yaíma, Pino Oriela, Correa Teresa M., Naranjo Eber, Iglesia Aleika. 2009. Estudio microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Caismón de anís). Rev. Protección Veg. Vol. 24 No. 1: 39-46.
32. Smith, P.A., J. Stewart y L. Fyfe. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters in Applied. Microbiology.
33. Soler Fayos. 2009. Cambios en la expresión génica asociados a la maduración interna del fruto de los cítricos: identificación de rutas metabólicas implicadas en la acumulación y eliminación de ácidos. Universidad politécnica de Valencia. Departamento de producción vegetal.
34. Solomons, G. 1988. Fundamentos de Química Orgánica. Editorial Limusa, 1era Ed. España.
35. Skoog Douglas A., Holler F. James, Crouch Stanley R. 2008. Principios de análisis instrumental (Sexta edición). CENGAGE Learning.

36. Tomotake H, Koga T, Yamato M, Kassu A, Ota F. 2006. Antibacterial activity of citrus fruit juices against *Vibrio* species. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 52(2):157-60.
37. Isman MB. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agricultura and an increasingly regulated world. *Ann Rev Entomol*; 51:45-66.
38. Van Der Becke. 1999. Glosario. <http://www.ufasta.edu.ar/ohcop/index.html>. Consultada Octubre 2002.
39. Van Der Laat S. Julio E. 1954. Estudio comparativo del contenido de ácido cítrico y vitamina C en el jugo de algunas variedades de *Citrus* de uso popular. *Rev. Biol.Trop.* 2(1):45-58
40. Yáñez X. Rueda, Lugo L. Mancilla, Parada D.Y. Parada. 2007. Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad valenciana) cultivada en labateca (norte de Santander, Colombia). *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, año/vol.5, número 001. Universidad de Pamplona. Bucaramanga, Colombia. pp. 3-8.