

Acción bactericida del aceite esencial de semillas *Citrus aurantium*, *C. sinensis*, *C. reticulata*

Bactericidal action of essential oil from *Citrus aurantium* seeds, *C. sinensis*, *C. reticulata*

María Monseratt Abud Espinoza

Universidad Autónoma de Nicaragua, Managua, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Química Industrial, Managua, Nicaragua.

<https://orcid.org/0000-0002-1314-3882>

mmonseabudes26@gmail.com

Elieth Antonieta Gutiérrez Narváez

Universidad Autónoma de Nicaragua, Managua, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Química Industrial, Managua, Nicaragua.

<https://orcid.org/0000-0003-3587-3146>

gutierrezelieth@gmail.com

Indira Sofía Guevara López

Universidad Autónoma de Nicaragua, Managua, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Managua, Nicaragua.

<https://orcid.org/0000-0001-5279-9123>

iguevara@unan.edu.ni

Rolando Barillas

Universidad Autónoma de Nicaragua, Managua, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Bioanálisis Clínico, Managua, Nicaragua.

<https://orcid.org/0000-0003-4392-904X>

rbarillas@unan.edu.ni

RESUMEN

Esta investigación se realizó con el objetivo de verificar la acción bactericida del aceite esencial de las semillas de *C. aurantium* L., *C. sinensis* L. *C. reticulata* L., ante las cepas *Escherichia coli* (ATCC) 25922 y *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923, representativas para Gram positiva y Gram negativa, con los aceites a distintas concentraciones mediante los métodos Kirby-Bauer y método modificado de pozos en agar. Así mismo, para constatar la disminución de la carga microbiana mediante el lavado de frutas y verduras, se utilizó el Método de conteo en placas, las frutas y verduras seleccionadas son empleadas para la preparación de ensaladas, sopas, salsas, jugos y postres, considerando que pueden contaminarse desde la cosecha y transferirse a otras fases, como el procesamiento, empaque, transporte, comercialización e inclusive en la preparación de producto. Una vez empleado las diferentes concentraciones de aceites en el lavado de frutas y verduras, se procedió

RECIBIDO

20/07/2021

ACEPTADO

15/12/2021

PALABRAS CLAVE

Aceites esenciales; acción bactericida; disminución de la carga microbiana.

a verificar la vida útil monitoreando las condiciones de tiempo, temperatura y exposición a la luz fueran las mismas. La investigación se realizó con la finalidad de elaborar un producto de insumo doméstico, comprobando que el aceite esencial *C. reticulata. L.*, posee mayor actividad antimicrobiana frente a ambas cepas bacterianas. Y finalmente al ser aplicada en el lavado de frutas y vegetales mostró una reducción de la carga microbiana y un aumento de la vida útil.

ABSTRACT

This research was carried out with the objective of verifying the bactericidal action of the essential oil of seeds of *C. aurantium. L.*, *C. sinensis. L.* *C. reticulata. L.*, against the strains *Escherichia coli* (ATCC) 25922 and *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923, representative for Gram positive and Gram negative, with the oils at different concentrations using the Kirby-Bauer and modified agar well method. The fruits and vegetables selected are used for the preparation of salads, soups, sauces, juices and desserts, considering that they can be contaminated from harvest and transferred to other phases, such as processing, packaging, transportation, marketing and even in the preparation of the product. Once the different concentrations of oils were used in the washing of fruits and vegetables, the shelf life was verified by monitoring the conditions of time, temperature and exposure to light. The research was carried out with the purpose of elaborating a product for domestic use, proving that the essential oil *C. reticulada. L.*, has greater antimicrobial activity against both bacterial strains. And finally, when applied in the washing of fruits and vegetables, it showed a reduction of the microbial load and an increase in the shelf life.

KEYWORDS

Essential oils; bactericidal action; reduction of microbial load.

INTRODUCCIÓN

La investigación se realizó con apoyo económico del Fondo para Proyectos de Investigación (FPI), de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua - Managua (UNAN- Managua); se pretende elaborar un producto a partir de los aceites esenciales de las semillas de la variedad *C. aurantium L.*, *C. sinensis L.*, y *C. reticulata L.*, que será utilizado como desinfectante bactericida orgánico para frutas y verduras; con la finalidad de reducir la mayor parte de la carga microbiana y mejorar la inocuidad de los alimentos al momento de ingerirlas.

La OMS (2007), 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”

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.*, para 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 de esta manera beneficiar al sector industrial, comercial y de manera indirecta a los consumidores.

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 y se trabajó bajo las mismas condiciones.

Con esta investigación se determina el rendimiento de extracción de aceite esencial a partir de semilla. De la misma manera comprobar la acción bactericida de los aceites esenciales *Citrus aurantium L.*, *Citrus sinensis L.*, y *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 constatar la disminución de carga microbiana, con la finalidad de sentar bases a un insumo doméstico de origen orgánico.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación es experimental, se realizó para cada variedad de aceite esencial un total de 13 repeticiones, se estableció en condiciones controladas la relación causa-efecto, se compararon los aceites esenciales obtenidos de las semillas de las tres variedades del género *Citrus sp.* en cuanto a mayor acción inhibitoria de las bacterias. Es de corte transversal: debido a que se tomaron los datos en un intervalo de tiempo determinado y se analizó su incidencia e interrelación en un momento dado.

Método de Extracción Aceite Esencial de semillas citrus por el Método Soxhlet

En esta investigación se eligió como solvente el etanol al 99 %, por su disponibilidad y menor toxicidad. En el equipo Soxhlet consiste en recircular los vapores condensados con ayuda de un sifón arrastrando consigo los principios activos de la materia prima, contenidos en los dedales de celulosa. Después de varios ciclos el compuesto deseado se concentra en el balón de destilación y se recupera la mayor parte del solvente.

Etapas de la Extracción de Soxhlet

Para la extracción con el equipo Soxhlet se tomó en cuenta: la selección del solvente, la muestra sólida y las condiciones de operación.

Durante la extracción en el Soxhlet y la recuperación el solvente se empleó el método de evaporación en el mismo equipo Soxhlet, tomando en cuenta que primero se eliminó y/o sacó del equipo extractor el cartucho de muestra, para producir la evaporación del solvente el cual se condensa posteriormente en el extractor, a la vez que también se produjo la concentración del aceite esencial en el balón.

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 (Rodríguez, Hernández y Gamboa, 2005).

1. El medio estándar fue el agar de Mueller-Hinton.
2. El plato Petri fue inoculado rayando la superficie entera en tres planos con asas bacteriológicas estéril introducido previamente en un inóculo estandarizado.
3. El plato Petri se incubo en posición invertida a 37° C durante 18 y/o 24 horas.
4. Para cada disco se midió el diámetro de la zona de inhibición producida

por el fármaco.

5. El aislado bacteriano se designó como sensible, moderadamente sensible o resistente, a través de comparaciones entre el diámetro de la zona estándar suministrado por el fabricante de cada disco.

Métodos modificados en pozos agar

Para evaluar la actividad bactericida del aceite esencial, se aplicó métodos modificados en pozos agar (Rodríguez, Hernández y Gamboa, 2005).

1. El agar Mueller-Hinton se inoculó masivamente en la superficie con la suspensión bacteriana y los controles, y se esperó 15 minutos para permitir la absorción de este en la superficie del medio.
2. Los medios fueron incubados a una temperatura aproximada de 37°C durante 18 y/o 24 horas.
3. 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 13 repeticiones para cada aislamiento bacteriano.

Método de Técnicas Básicas de conteo en placas

Siguiendo la metodología de Díaz et al (2014), se consideró que cada colonia que se desarrolló en el medio de cultivo después de cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, provino de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra en estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia. 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 este estudio, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra.

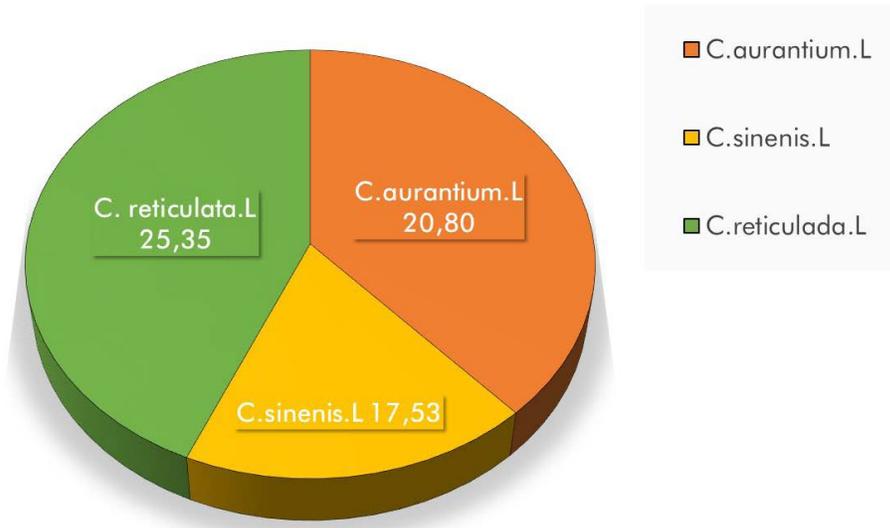
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de aceites esenciales en semillas de variedades

Para evaluar el rendimiento se llevó a cabo con 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.

Las variedades de las semillas en estudio fueron evaluadas 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.

Gráfico 1. Comparación Porcentaje de Rendimiento de aceites esenciales



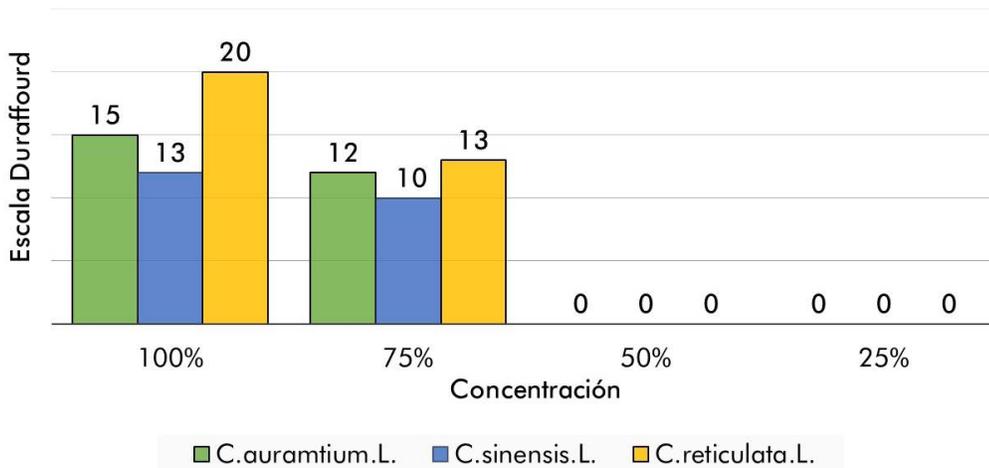
Nota. Los datos son expresados en porcentaje

Como se muestra en el Gráfico 1, el rendimiento es expresado en porcentaje, dado que se está determinando el rendimiento con base al método gravimetría-volumétrico, utilizando la misma cantidad de muestra 259,492 g, dependiendo de la capacidad de cada balón a los balones de 250 mL, se adicionó 275 mL y al balón de 500 mL se le adiciono 475 mL de solvente, el tiempo de extracción es de 7 horas dada la capacidad del método, se obtienen un porcentaje similar de extracción entre los aceites esenciales, destacando con 25,35% la variedad *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.

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

A través del método de Kirby-Bauer permitió conocer a que concentración el aceite esencial actúa inhibiendo el crecimiento de la cepa en estudio. Cada disco se impregnó 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.

Gráfico 2. Comparación de acción inhibitoria en cepa Escherichia coli (ATCC) 25922



Nota. Datos del halo de inhibición mostrado en mm.

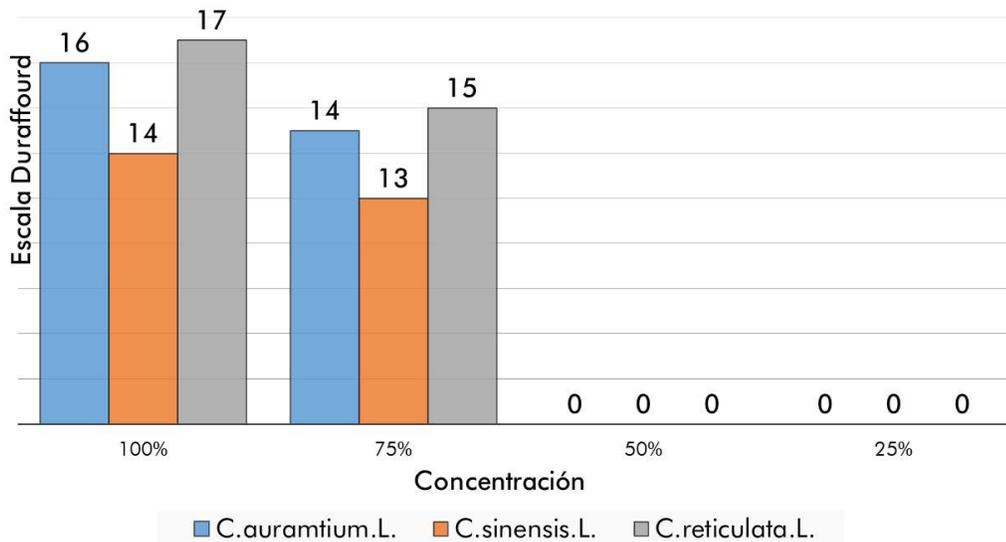
El Gráfico 2, muestra la comparación de acción bactericida de los aceites esenciales diluidos a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% frente a la cepa de referencia *Escherichia coli* (ATCC) 25922 empleando el método de Kirby-Bauer, se determinaron los halos inhibitorios de los platos Petri. Demostrando una mayor acción bactericida la concentración realizada al 100%, los halos determinados presentaron promedios de 15 mm, 13 mm, y 20 mm, al 75% la efectividad logró halos de 12 mm, 10 mm y 13 mm de promedio y a concentraciones menores de 50% y 25% no mostraron acción bactericida, como control positivo se utilizó la Gentamicina 10µg/mL alcanzó un halo promedio de 20 mm.

Basándonos en las pautas de la Escala de Duraffourd del rango de actividad; los aceites esenciales presentaron halos promedios de inhibición *C. aurantium L.*, 15 mm considerándose Muy Sensible, *C. sinensis L.*, 12 mm Sensible, la variedad *C. reticulata L.*, 20 mm Sumamente sensible, mostrando buenos resultados frente a la cepa. Es necesario recalcar que los aceites esenciales a 75% también presentan acción bactericida frente a la cepa, con halos de medición: la variedad *C. aurantium L.*, 12 mm, *C. sinensis L.*, 10 mm y *C. reticulata L.*, 13 mm considerándose según el rango de actividad de la escala de Duraffourd como Sensible.

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.

Gráfico 3. Comparación de la acción inhibitoria en la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923



Nota. Datos de la medición de los halos de inhibición mostrado en mm.

En el Gráfico 3 se compara la acción bactericida de los aceites esenciales diluidos a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%, mediante método de susceptibilidad Kirby-Bauer, se determinó la medición de los halos inhibitorios de los platos Petri, presentados por los aceites esenciales frente a la cepa de Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923. Mostrando halos promedios de 16 mm, 14 mm y 20 mm a concentración de 100%, al 75% la efectividad alcanzó halos de 14 mm, 13 mm y 15 mm de promedio y a concentraciones menores de 50% y 25% no presentan acción inhibitoria. La Gentamicina 10µg/mL obtuvo un halo promedio de 20mm.

Mediante la de Escala de Duraffourd del rango de actividad, de los aceites esenciales a concentración de 100% presentaron halos de inhibición *C. aurantium L.*, 16 mm considerándose Muy Sensible, 14 mm *C. sinensis L.*, sensible, la variedad *C. reticulata L.*, 20 mm sumamente sensible, mostraron buenos resultados frente a la cepa.

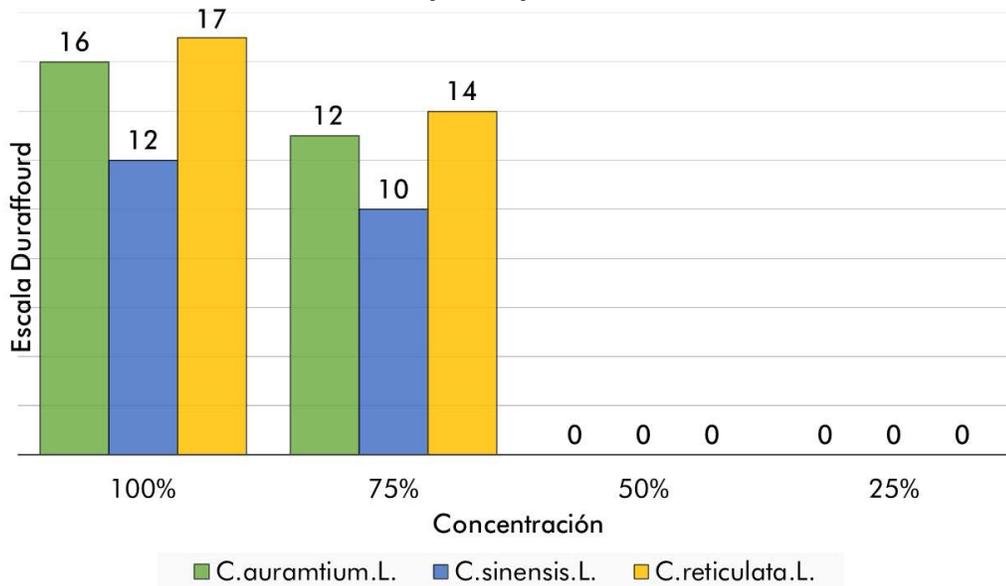
Es preciso recalcar que los aceites esenciales a 75% también presentan acción bactericida frente a la cepa, con rango de acción bactericida, la variedad *C. aurantium L.*, 14 mm Muy Sensible, *C. sinensis L.*, 13 mm Sensible y *C. reticulata L.*, 15 mm muy sensible.

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 a concentraciones reducidas de 50 % y 25 %. Se observa que el máximo de efectividad inhibitoria se alcanza en la concentración 100%

Gráfico 4. Comparación de acción bactericida en cepa *Escherichia coli* (ATCC) 25922



Nota. Datos de la medición de los halos de inhibición mostrado en mm.

El Gráfico 4, comparó la acción bactericida de los aceites esenciales diluidos a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% frente a la cepa de referencia *Escherichia coli* (ATCC) 25922 empleando el método modificado de pozos en agar, se determinaron los halos inhibitorios de los platos Petri. Demostrando una mayor acción bactericida la concentración realizada al 100%, los halos presentaron promedios de 16mm, 12 mm y 17 mm al 75% la efectividad alcanzó un halo de 12 mm, 10 mm y 14 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.

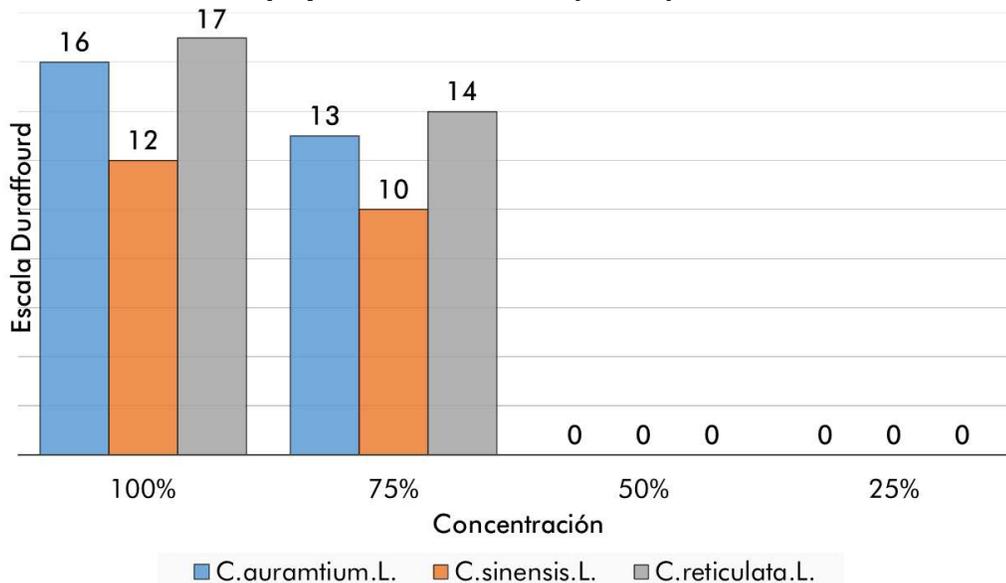
Basado en las pautas de la Escala de Duraffourd del rango de actividad, los aceites esenciales presentaron halos de inhibición *C. aurantium L.*, 15 mm considerándose Sensible, *C. sinensis L.*, 12 mm Sensible, la variedad *C. reticulata L.*, 16 mm Muy Sensible a concentraciones de 100 %. Es preciso 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.*, 12 mm sensible, *C. sinensis L.*, 10 mm sensible y *C. reticulata L.*, 14 mm sensible.

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 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 5. Comparación de acción bactericida en cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923



Nota. Datos de la medición de los halos de inhibición mostrado en mm.

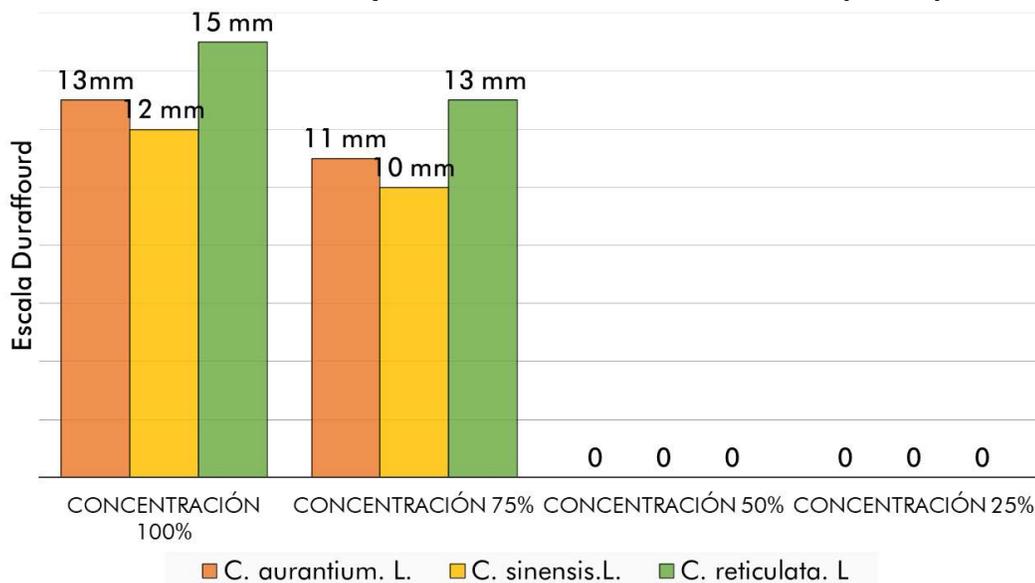
Como se puede apreciar en el gráfico 5, la acción bactericida de los aceites esenciales diluidos a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% frente a la cepa de referencia Gram positiva, los aceites esenciales presentaron inhibición, obteniendo los siguientes resultados de sensibilidad; la variedad *C. aurantium* L., 16mm se considera muy sensible, *C. sinensis* L., 12 mm sensible, la variedad *C. reticulata* L., 16 mm muy sensible a concentraciones de 100 %.

Los aceites esenciales en concentración de 75% también presentan acción bactericida, presentando acción de inhibición según el rango de actividad bactericida, la variedad *C. aurantium* L., 13 mm sensible, *C. sinensis* L., 10 mm sensible, mostró mejores resultados la *C. reticulata* L., 14 mm sensible. Pero a concentraciones menores de 50 % y 25% no presenta acción bactericida.

Cabe resaltar que los aceites esenciales mostraron un mayor efecto inhibitorio frente a cepa Gram (+). Este comportamiento probablemente se debe a que la pared celular de las bacterias, 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.

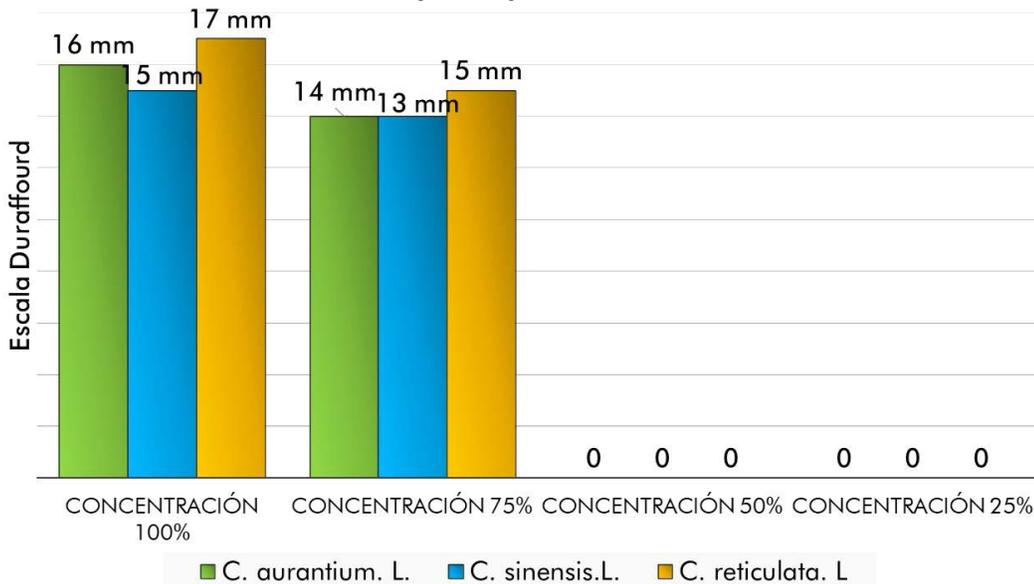
Comparación de la acción bactericida de los aceites esenciales almacenados 2018- 2020 frente a las cepas referencia Escherichia coli (ATCC) 25922 y Staphylococcus aureus (ATCC) 25923

Gráfico 6. Comparación de acción inhibitoria de los aceites esenciales frente a las cepas referencia Escherichia coli (ATCC) 25922



Nota. Los datos mostrados de los halos de inhibición de los aceites esenciales almacenados durante dos años

Gráfico 7. Comparación de acción inhibitoria de los aceites esenciales frente a las cepas referencia *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923

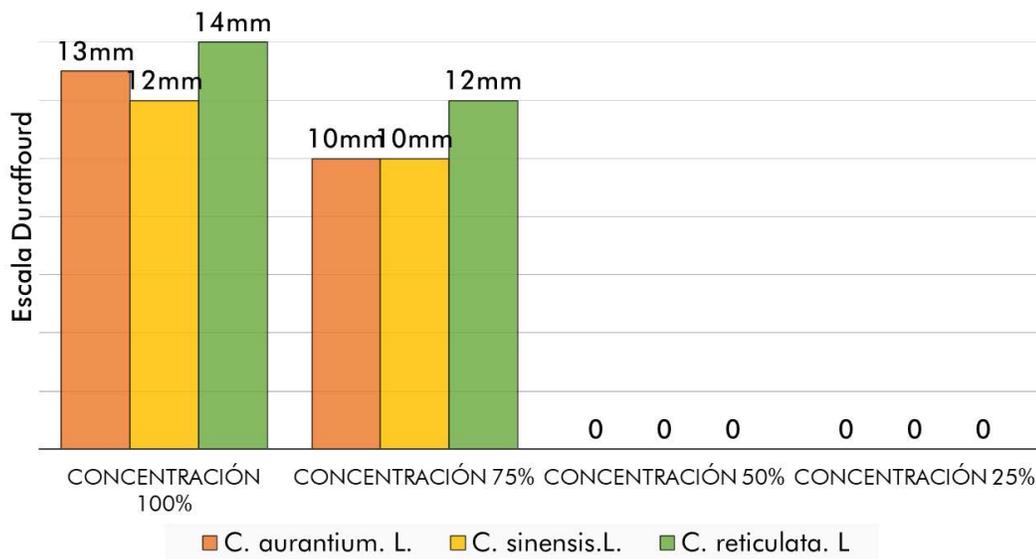


Nota. Los datos mostrados de los halos de inhibición de los aceites esenciales almacenados durante dos años

En los gráficos 6 y 7, se muestran la acción bactericida presentada por los aceites esenciales, diluidos a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%, los cuales se almacenaron durante dos años a temperatura ambiente y en frascos color ámbar para evitar la degradación por la incidencia de la luz, se comprobó la acción bactericida de los aceites esenciales contra la cepa referencia Gram (-) y Gram (+), presentando mejores resultados para la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923.

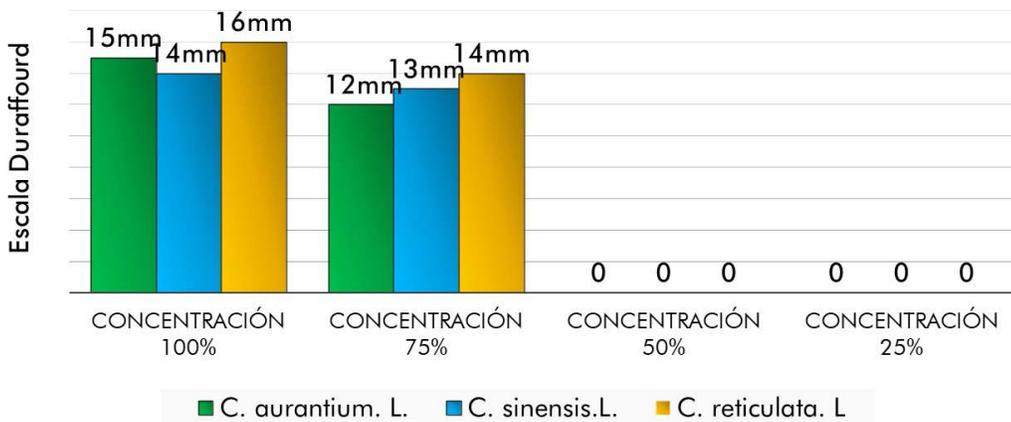
Con ayuda del método de Kirby Bauer se determino la acción bactericida y se clasificó según el rango de la actividad antimicrobiana de la escala de Duraffourd, las variedades presentaron halos inhibitorios promedio 13 mm, 12 mm, y 15 mm, siendo la concentración más efectiva la realizada al 100% al 75% la efectividad alcanzó halos inhibitorios de 11 mm, 10 mm y 13 mm de promedio clasificándose según el rango de efectividad como sensibles a concentraciones menores de 50% y 25% no mostraron actividad bactericida y el control positivo obtuvo un halo promedio de 20 mm.

Gráfico 8. Comparación de acción inhibitoria de los aceites esenciales frente a las cepas referencia Escherichia coli (ATCC) 25922



Nota. Los datos mostrados de los halos de inhibición de los aceites esenciales almacenados durante dos años

Gráfico 9. Comparación de acción inhibitoria de los aceites esenciales frente a las cepas referencia Staphylococcus aureus (ATCC) 25923



Nota. Los datos mostrados de los halos de inhibición de los aceites esenciales almacenados durante dos años.

Como se puede apreciar en los gráficos 8 y 9, los datos obtenidos con ayuda del método modificado de pozos agar, se utilizaron los aceites esenciales diluidos a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100, los cuales muestran halos inhibitorios de 15mm, 14mm y 16mm, considerándose como uy

sensibles a concentraciones de 75% mostraron halos de 12mm, 13mm y 14mm, los cuales se consideran como sensibles, a concentraciones menores de 50% y 25% no presentan actividad bactericida frente a la cepa en estudio.

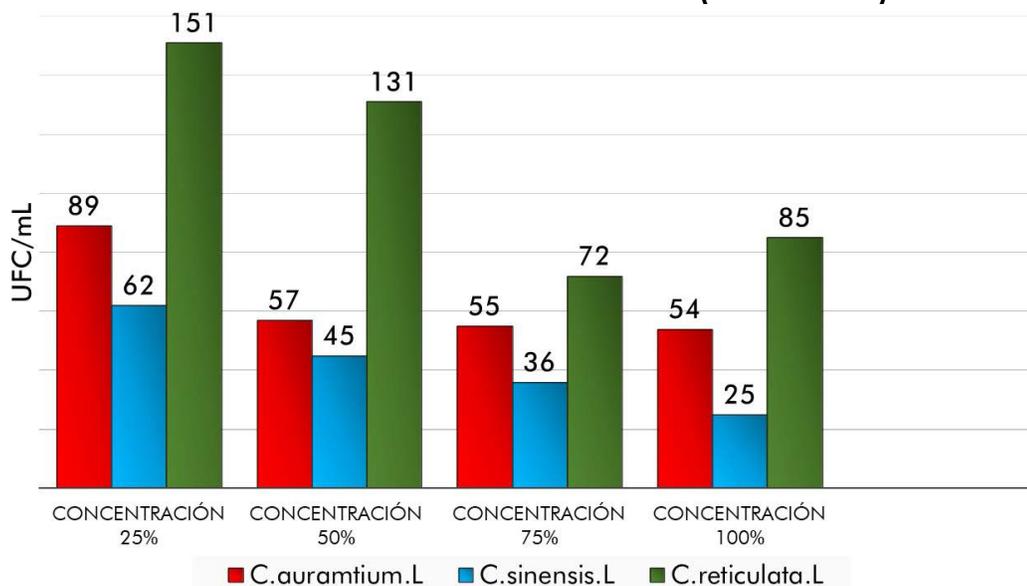
Las bacterias Gram positivas son más susceptibles a diferentes tipos de aceites esenciales que las bacterias Gram negativas, esto se evidencia claramente en los resultados obtenidos con la bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923; y *Escherichia coli* (ATCC) 25922 fue más resistente frente a las concentraciones propuestas de 100% y 75%.

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 las muestras, se aplicó 5 mL directamente y se enjuago con agua destilada estéril, 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 10. Lavado de las verduras (zanahorias)



Nota. Los datos mostrados se deben a la disminución de la carga microbiana

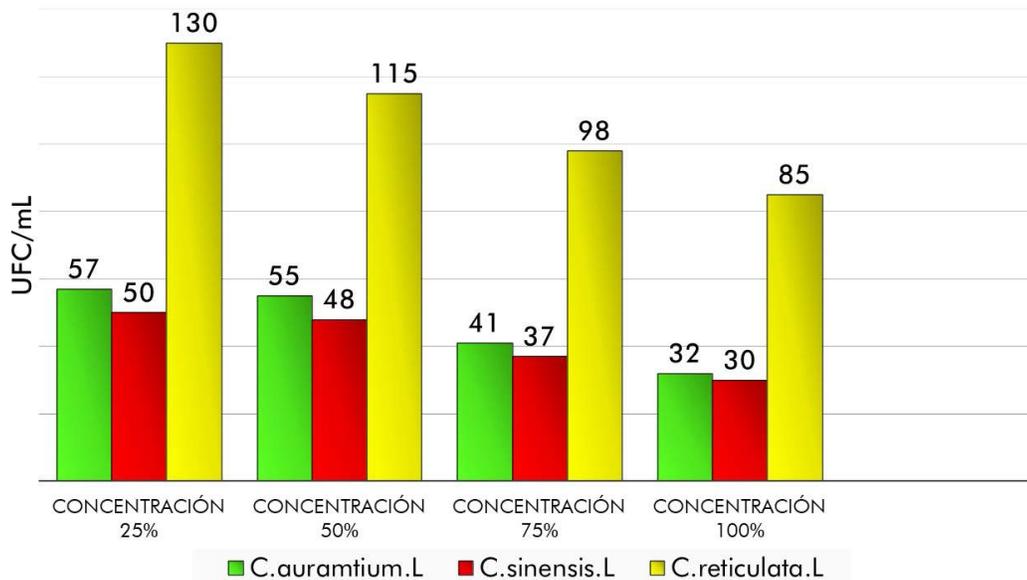
La disminución microbiana permitió conocer a que concentración el aceite esencial puede actuar disminuyendo el crecimiento de microorganismos. La muestra se trató con las distintas diluciones 100%, 75%, 50% y 25% de aceites esenciales en estudio, se eligió control como positivo Cloro. Como podemos apreciar en el gráfico 10, 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.

Disminución de carga microbiana en lavado de frutas (tomates) 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 11. Lavado de las frutas (tomates) con los aceites esenciales



Nota. Los datos mostrados indican la disminución de la carga microbiana

A través de los datos mostrados en el gráfico 11, la disminución de carga microbiana se muestra utilizando los aceites esenciales a concentración 100%, 75%, 50% y 25% para el lavado de la muestra y observar si hay 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 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 (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", el tiempo de vida útil de esta muestra no tratada fue de 5 días, las muestras tratadas con agua clorada (control positivo) sufrieron daño en la superficie de las frutas y verduras. Visualmente se encuentra una reducción de colonias en muestras tratadas con los aceites esenciales la vida útil de las frutas y verduras después de ser tratadas con los aceites esenciales es de 12 días. Las muestras se encontraban bajo las mismas condiciones (temperatura, exposición a la luz, y tiempo).

CONCLUSIONES

Los aceites esenciales obtenidos de las semillas *C. aurantium L.*, *C. sinensis L.*, y *C. reticulata L.* utilizando como solvente el etanol, puede ser usado en cualquier tipo de frutas y verduras.

Mediante este estudio, se puede concientizar del beneficio que se obtiene en usar un desinfectante para alimento, más siendo de aceites esenciales de las semillas de *Citrus* un producto orgánico. Este proyecto es viable para las industrias que trabajan directamente con las frutas *C. aurantium L.*, *C. sinensis L.*, y *C. reticulata L.* para darle rentabilidad aun desecho, obteniendo un subproducto.

En base a los resultados se encontró una reducción de la carga microbiana en muestras tratadas con los aceites esenciales y una vida útil de las frutas y verduras de 12 días después de ser tratadas con los aceites esenciales. Las muestras se encontraban bajo las mismas condiciones (temperatura, exposición a la luz, y tiempo).

Se constató que los aceites esenciales tienen una durabilidad de dos años presentando buena actividad bactericida.

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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ceballos, M. A. (2012). ANÁLISIS DE PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS. Guatemala.
- Díaz, Barrio Pilar, Darré, López, et al; (2014). Análisis Microbiológico de los Alimentos. Anmat. p.17-18
- Duraffourd, C., Hervicourt, L., y Lapraz, J. C. (1987). *Cuaderno de Fitoterapia Clinica*. Barcelona : Masson.
- Rodríguez Cavallini, E., Gamboa Coronado, M. M., Hernández Chavarría, F., y García Hidalgo, J. D. (, 2005). *Bacteriología General* . San José: Universidad de Costa Rica.
- Organización Mundial de la Salud. (2007). *Manual sobre las Cinco claves para la inocuidad de los alimentos*. Francia: Ediciones de la OMS.