
**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE CALKINÍ**

**“EFECTO ANTIMICRIOBIANO DE ACEITES ESENCIALES
DE CÁSCARA DE LIMÓN DULCE”**

TESIS PARA TITULACIÓN INTEGRAL

INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

EGRESADA

MARIA ELIZABETH EUAN IZQUIERDO

DIRECTOR

DR. YASSER ALEJANDRO CHIM CHI

CODIRECTOR

DR. MARIO ADRIÁN DE ATOCHA DZUL CERVANTES

Calkiní, Campeche, México 2025



Educación
Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico Superior de Calkiní
Subdirección de Planeación y Desarrollo

Instituto Tecnológico Superior de Calkiní
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante

Calkiní, Campeche **07/03/2025**
P/03/25/611

INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

CONSTANCIA DE NO INCONVENIENCIA

MODALIDAD: TESIS

C. MARIA ELIZABETH EUAN IZQUIERDO 7321
PASANTE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS.
PRESENTE

Con relación a lo establecido en el Reglamento de Estudios de Licenciatura, capítulo VII, fracción I, vigente en este Instituto, y una vez emitido el fallo favorable por el director DR. YASSER ALEJANDRO CHIM CHI, y el co-director DR. MARIO ADRIAN DE ATOCHA DZUL CERVANTES, respectivamente, este Instituto consta de no tener inconveniencia para la realización del acto protocolario de titulación integral de su trabajo profesional titulado: **"EFECTO ANTIMICROBIANO DE ACEITES ESENCIALES DE CÁSCARA DE LIMÓN DULCE"**.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría, Fortaleza de Nuestra Cultura®

Dr. Jorge Alfonso Hau Puc.
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante.

C.c.p. Archivo



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR
DE CALKINÍ
DEPARTAMENTO DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR Y APOYO A
ESTUDIANTES
CLAVE: 04MSU0013P
CALKINÍ, CAMPECHE, MÉXICO



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Ah Canul S/N por Carretera Federal, Calkiní, Campeche,
C.P. 24900 Tel. 996-8134870,
e-mail: se_dcalkini@tecnm.mx | itescam.edu.mx



DEDICATORIA

A mis padres Marbella Izquierdo Diaz y Luis Armando Euan Euan que me dieron la vida, mucho amor y su apoyo incondicional a lo largo de todo este proceso, que me permitieron vivir una etapa universitaria maravillosa, que estuvieron conmigo alentándome, especialmente a mi madre, que estuvo en los momentos más difíciles.

A mis hermanos Cinthia Jazmin Euan Izquierdo y Luis Fernando Euan Izquierdo por ser mis compañeros de vida, por todos los bellos momentos juntos, por todas las risas y por levantarme el ánimo cada que lo necesitaba.

Para mi mejor amiga Itzel Esperanza Barenca Flores, por todos sus años de amistad sincera e incondicional, por nunca alejarse a pesar de la distancia, por celebrar todos mis logros como si fueran suyos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la institución, el ITESCAM por hacer posible mi formación profesional al aceptarme y permitirme estudiar la carrera de Ingeniería en Industrias Alimentarias y a cada docente que me transmitieron los conocimientos que hoy en día tengo.

Agradezco especialmente a mi asesor, el Dr. Yasser Alejandro Chim Chi por permitirme la oportunidad de trabajar con él, por todos los conocimientos adquiridos, así como por el entusiasmo que me transmitió en cada clase, por su paciencia y su orientación a lo largo de la realización de este proyecto.

A Dios, por permitirme vivir cada momento que me llevó a estar en esta parte de mi vida, que me puso en el lugar donde debía estar en el momento preciso, por darme salud, paciencia y fortaleza. Por darme unos padres que siempre estuvieron dándome ánimos para seguir adelante.

A todos mis seres queridos y amigos por su cariño, por verme crecer a lo largo de estos años dándome la fuerza necesaria, la motivación para lograr mis metas. Gracias a las amigas que me dio la carrera Ale, Merli, Sherla y Nayeli; porque me hicieron parte de su vida y por crear bonitos recuerdos juntas.

ÍNDICE

Capítulo I Introducción.....	1
Capítulo III Resumen	2
Capítulo III Antecedentes.....	3
Capítulo IV Marco Teórico	6
4. 1 Generalidades de los Cítricos	6
4.2 Propiedades de los Cítricos.....	6
4.3 Subproductos de los Cítricos	7
4.4 Aceites Esenciales	7
4.5 Métodos de Extracción de Aceites Esenciales	8
4.5.1 Expresión	8
4.5.2 Destilación por Arrastre de Vapor de Agua	8
4.5.3 Extracción con Solventes Volátiles	9
4.5.4 Enflorado o Enfleurage.....	9
4.5.5 Extracción con Fluidos Supercríticos	9
4.6 Destilación por Arrastre de Vapor.....	9
4.7 Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial	10
Capítulo V Justificación	11
Capítulo VI Objetivos.....	12
6.1 Objetivo General.....	12
6.2 Objetivos Específicos	12
Capítulo VII Materiales y Métodos	13
7.1 Metodología General del Proceso	13
7.2 Obtención de la Materia Prima.....	14
7.3 Obtención de Aceite Esencial por Arrastre de Vapor.....	14
7.4 Caracterización Fisicoquímica del Aceite Esencial de Limón Dulce.....	14
7.4.1 Acidez.....	15

7.4.2 pH	15
7.4.3 Índice de Refracción.....	15
7.4.4 Densidad	15
7.4.5 Color	16
7.5 Actividad Antimicrobiana	16
7.5.1 Preparación de Medios de Cultivo.....	16
7.5.2 Esterilización de Material para Análisis Microbiológico	16
7.5.3 Preparación de la Muestra	17
7.5.4 Crecimiento de la Bacteria <i>Escherichia coli</i> en Caldo Lauril Sulfato.....	17
7.5.5 Crecimiento de la Bacteria <i>Escherichia coli</i> en Caldo Verde Billis Brillante.....	17
7.5.6 Siembra de Bacteria <i>Escherichia coli</i> en Agar Mac Conkey	18
7.5.7 Técnica de la Gota Miles-Misra	18
7.6 Caracterización Antioxidante	18
Capítulo VII Resultados y Discusión	19
8.1 Rendimiento del Aceite Esencial de Limón Dulce.....	19
8.2 Caracterización Fisicoquímica del Aceite Esencial.....	21
8.3. Actividad Antimicrobiana	24
8.3.1 Crecimiento de la Bacteria <i>Escherichia coli</i> en Caldo Lauril Sulfato.....	24
8.3.2 Crecimiento de la Bacteria <i>Escherichia coli</i> en Caldo Verde Billis Brillante.....	24
8.3.3 Inhibición Bacteriana con Técnica de la Gota Miles-Misra	25
8.3.4 Tamaño de los Halos de Inhibición	26
8.5 Caracterización Antioxidante del Aceite Esencial de Limón Dulce	27
Capítulo IX Conclusión	29
Capítulo X Recomendaciones	30
Capítulo XI Referencias	31
Capítulo XII Anexos.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama general del proceso.....	13
Figura 2 Limón dulce.	14
Figura 3 Tabla de equivalencias entre el valor Brix (%) y el índice de refracción (nD).	22
Figura 4 Diluciones en caldo lauril sulfato.....	24
Figura 5 Diluciones en caldo verde bilis brillante.....	24
Figura 6 Siembra de la bacteria con hisopo y técnica de la gota (Miles-Misra).	25
Figura 7 Inhibición bacteriana 1 día después de la siembra.	25
Figura 8 Inhibición bacteriana 4 días después de la siembra.	26
Figura 9 Halos de inhibición del aceite esencial de limón dulce.	26
Figura 10 Medición de los halos de inhibición del aceite esencial de limón dulce.....	27
Figura 11 Equipo armado de destilación por arrastre de vapor.....	34
Figura 12 Frascos con el aceite esencial obtenido.....	34
Figura 13 Muestra de cilantro.....	35
Figura 14 Fórmula para calcular acidez y tabla de factor de algunos ácidos de las frutas.	35
Figura 15 Fórmula para calcular el índice de color (IC), interpretación de los resultados del (IC).....	35
Figura 16 Representación de L, a y b en el sistema CIELAB.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resultados obtenidos de las tres extracciones.	19
Tabla 2 Segunda parte de la realización de extracciones.....	20
Tabla 3 Parámetros fisicoquímicos del AE de limón dulce.	21
Tabla 4 Valores de los parámetros L, a y b.	23
Tabla 5 Porcentaje de inhibición de la muestra al minuto 0 y al minuto 30.....	28

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 Obtención de aceite esencial por arrastre de vapor.	34
ANEXO 2 Frascos del aceite esencial.	34
ANEXO 3 Muestra para el crecimiento de la bacteria <i>Escherichia coli</i>	35
ANEXO 4 Calculo de acidez titulable.	35
ANEXO 5 Índice de color.....	35
ANEXO 6 Sistema CIELAB.....	36

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

Un aceite esencial se define como el extracto volátil de una planta, que contiene los compuestos aromáticos responsables de su fragancia distintiva. Cada planta tiene un perfil químico único que se refleja en la composición del aceite que produce.

Los aceites esenciales han captado el interés de diversas disciplinas debido a su amplio rango de aplicaciones en la medicina natural, la cosmética, la aromaterapia y la industria alimentaria. Estos extractos altamente concentrados, obtenidos de plantas mediante destilación o prensado en frío, aunque el método más utilizado es el de arrastre de vapor, han sido utilizados desde tiempos ancestrales en diferentes culturas por sus propiedades terapéuticas y aromáticas. Sin embargo, más allá de la tendencia actual que rodea a estos aceites, resulta esencial analizar su naturaleza, mecanismos de acción y los beneficios que aportan a la industria alimentaria con las recientes investigaciones respecto a su uso para la inhibición de microorganismos patógenos en alimentos debido a la creciente contaminación de estos por diversos factores. De acuerdo con esta problemática se busca una alternativa de solución natural haciendo el uso de aceites esenciales ya que se han reportado efectos positivos en cuanto a la inhibición de ciertas bacterias.

En esta investigación se hace el uso de las cáscaras del limón dulce que es un injerto poco conocido en el estado de Campeche del cual se busca que tenga efectos similares a los reportados de otros cítricos como la naranja, limón, mandarina y toronja; además de que se hace uso de “desperdicios” aprovechando casi en su totalidad las partes de la fruta.

CAPÍTULO II RESUMEN

Los aceites esenciales se definen como fracciones líquidas volátiles que comúnmente son extraídos mediante el arrastre de vapor de agua, estas sustancias obtenidas son las responsables del aroma de las plantas. Los aceites esenciales son de importancia en la industria cosmética, farmacéuticos y de alimentos.

Este proyecto presenta los resultados de la investigación de la inhibición de microorganismos patógenos mediante el uso del aceite esencial de las cáscaras del limón dulce campechano. El fin de la presente investigación radica en aprovechar el desecho de este fruto que es la cáscara, a la cual se le hace uso para pruebas de inhibición bacteriana. La extracción del aceite esencial de las cáscaras se realizó con el método de destilación por arrastre de vapor que es un método utilizado a nivel industrial pero que también se puede realizar a escala de laboratorio. Se cortó la cascara del limón dulce en pedazos pequeños y se resguardó en el congelador en un tiempo de mínimo 1 hora para después ser usado para la extracción. Este procedimiento se realizó 3 veces. Para hacer el cálculo del rendimiento se tomaron los datos del peso de la muestra por los gramos de aceite esencial extraídos en cada una de las extracciones. Se realizó el primer paso del objetivo de esta investigación obteniendo la mayor cantidad de aceite esencial para posteriormente realizar las demás pruebas necesarias.

Se realizaron pruebas fisicoquímicas en el aceite esencial, dichas pruebas fueron acidez, pH, índice de refracción, densidad y color; se realizó una caracterización antioxidante, así como el análisis microbiológico con la bacteria *Escherichia coli*.

El aceite esencial de limón dulce presentó actividad antimicrobiana contra la bacteria *Escherichia coli*, con la técnica de la gota de Miles-Misra.

CAPÍTULO III ANTECEDENTES

Se han realizado estudios acerca de la inhibición bacteriana con aceites esenciales del limón persa en México ya que este limón es de importancia comercial en el país por su alto consumo en la industria al ser utilizado para la fabricación de jugos, así como también la implementación de la extracción del aceite esencial.

Debido a la contaminación de los alimentos por microorganismos es que se ha tomado la alternativa de origen natural de utilizar los aceites esenciales como bioconservadores en alimentos que atraen a los consumidores por ser conservadores naturales inocuos. Aunque la información respecto al tema de inhibición de microorganismos por medio de aceites esenciales de cítricos es limitada se han obtenido registros de datos positivos respecto al tema que incentivan a la realización de más investigaciones al respecto.

Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón persa (Citrus latifolia Tanaka) (Montero, Y., 2009)

Esta investigación se realizó en el estado de Veracruz por la Universidad Veracruzana Instituto de Ciencias Básicas en el año 2009, investigación en la que se extrajo el aceite esencial del limón persa para determinar el efecto inhibitorio sobre bacterias Gram negativas *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomona aeruginosa*. En este estudio se encontró que había una mayor actividad antimicrobiana en las bacterias Gram positivas con los aceites esenciales de *C. latifolia* y *C. volkameriana*, esto debido a la permeabilidad de la membrana que rodea a las bacterias que permite mayor difusividad del aceite esencial al interior de la célula bacteriana.

Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género Citrus (Torrenegra, M., et al., 2017)

En Colombia también se realizó una investigación de la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género citrus frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, determinando la concentración mínima

inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). En este trabajo se utilizó el método de hidrodestilación e hidrodestilación asistida para la obtención de los aceites esenciales de naranja, limón, mandarina y pomelo, de acuerdo con sus resultados obtenidos los aceites esenciales mostraron un mayor efecto inhibidor frente a cepas Gram negativas y respecto al rendimiento de los aceites esenciales fue diferente en cada tipo de extracción.

Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina (Martínez et al., 2003)

En este artículo se estudió la actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina variedad Dancy (*Citrus reticulata* Blanco) en Nirgua, Venezuela. Se utilizaron cepas bacterianas de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Para la extracción del aceite esencial se utilizó el método de prensado al frío para minimizar la oxidación de compuestos oxigenados o cualquier otro deterioro. Para este estudio se utilizaron 11 concentraciones de aceite esencial las cuales fueron 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%, el aceite esencial presentó actividad antimicrobiana contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*, en todas las concentraciones menos la de la concentración del 1%. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *B. subtilis* fue de 9%, para *S. aureus* y *L. monocytogenes* fue del 7%.

Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de Cymbopogon citratus (DC) (Guerra, M., et al., 2004)

En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (DC) mejor conocida como zacate limón, investigación realizada en la ciudad de la Habana, Cuba. El aceite esencial se obtuvo mediante destilación por arrastre de vapor de agua, se emplearon microorganismos controles en las que una batería de microorganismos controles estaba integrada por 8 bacterias en las que se encontraba la *Escherichia coli*, la segunda batería de control estuvo compuesta por 4 hongos dermatofitos. El aceite esencial mostró actividad antifúngica superior a la de la crema, la formulación que se desarrolló resultó no irritante, la especie microbiana más sensible resultó ser *Trichophyton rubrum*.

Determinación de la actividad antibacteriana de tres variedades de limón (Citrus limón (L) Osbeck, Citrus limón (L) Osbeck en combinación con Citrus reticulata y Citrus medica L.) frente a Staphylococcus aureus y Escherichia coli (De Silva, A., 2015)

En esta investigación se extrajo el aceite esencial de diferentes partes del limón, dichas partes fueron las hojas, cáscaras y semillas en las que solo los aceites esenciales extraídos de las hojas y cáscaras fueron los que obtuvieron resultados positivos en cuanto a la inhibición de *Staphylococcus aureus*, en cambio respecto a la bacteria *Escherichia coli* solo hubo inhibición con el aceite esencial obtenido de las hojas.

CAPÍTULO IV MARCO TEÓRICO

4.1 GENERALIDADES DE LOS CÍTRICOS

La familia *Rutaceae* incluye variedades de cítricos, con *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunela* como los géneros más importantes. La mayoría de las especies del género *Citrus* son las más importantes desde un punto de vista agronómico. *Citrus aurantifolia* (limón pajarito), *Citrus latifolia* (limón tahití), *Citrus aurantium* (naranja amarga), *Citrus grandis* (pummelo), *Citrus limon* (limón verdadero), *Citrus paradisi* (toronja o pomelo), *Citrus reticulata* (mandarina) y *Citrus sinensis* son las especies de cítricos más comunes (Ordúz-Rodríguez & Mateus-Cagua, 2012).

Actualmente no existe información acerca del limón dulce ya que este fruto es un injerto que se encuentra mayormente en el estado de Yucatán y parte del norte del estado de Campeche.

La Real Academia Española define la palabra injerto como “parte de una planta con una o más yemas, que, aplicada al patrón, se suelda con él” (RAE & RAE, 2024). Es decir, cuando dos plantas se unen forman un injerto creando una nueva planta que tiene componentes de ambas plantas originales.

4.2 PROPIEDADES DE LOS CÍTRICOS

Los cítricos se encuentran en una posición especial en el mundo de las plantas, sus características anatómicas son únicas y tienen un lugar destacado en la alimentación humana. La industrialización de los cítricos no solo se enfoca en la extracción de jugos, sino que también posibilita la producción de varios subproductos diferentes, en la actualidad la relación alimentos-medicina está siendo considerada de importancia para la salud.

En cuanto a los beneficios del consumo de los cítricos están basados en sus propiedades antioxidantes y antirradical de los componentes de los cítricos como lo es el ácido ascórbico, flavonoides, carotenoides, derivados del ácido cinámico, los cítricos son buena fuente de vitamina C, así como también la presencia de compuestos fenólicos (Domínguez, E. & Ordóñez, E. 2014).

4.3 SUBPRODUCTOS DE LOS CÍTRICOS

En la industria alimentaria es común el uso de cítricos para la fabricación de jugos, concentrados, néctares, mermeladas, jaleas de naranja, mandarina, toronja y limón. Lo cual deja como residuo o desperdicio las cáscaras de estos cítricos con los que se pueden realizar subproductos como lo son los aceites esenciales y las pectinas, subproductos con mayor valor agregado en comparación a los nutrientes en alimentación animal o en forma de *pellets* (Perea, J., et al., 2024).

Las pectinas en la industria de alimentos se usan como espesantes, gelificantes, emulsificantes y estabilizantes, además de que la pectina por ser una fibra soluble disminuye las fracciones de lipoproteína de baja densidad en la sangre. Los aceites esenciales son empleados en la elaboración de perfumes, licores, artículos de aseo, como enmascaradores de olores de pintura y como materias primas en la elaboración de productos farmacéuticos.

4.4 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales se definen como fracciones líquidas volátiles que comúnmente son extraídos mediante el arrastre de vapor de agua, las sustancias obtenidas son las responsables del aroma de las plantas, los aceites esenciales son de importancia en la industria cosmética, farmacéuticos y de alimentos. Los aceites esenciales son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes y la mayoría de los aceites esenciales son de olor agradable pero también existen los de olor desagradable ya que pueden contener compuestos azufrados (Martínez, 2001).

Son líquidos a temperatura ambiente, aromáticos y ligeros, su densidad es inferior a la del agua, aunque existen excepciones. Los aceites esenciales en comparación a los aceites vegetales son volátiles y su textura no es grasa, su punto de ebullición son mayores a los de agua, en cuanto a su solubilidad son insolubles en agua y en otros disolventes polares, pero son solubles en alcohol, cloroformo o acetona (Laso, M., et al., 2018).

Los aceites esenciales se clasifican en base a su consistencia, origen y naturaleza química de sus componentes, también se clasifican de acuerdo con su consistencia en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas, estas sustancias pueden ser naturales, artificiales y sintéticas.

En cuanto a su composición química, los aceites esenciales son mezclas de elevada complejidad y que principalmente son constituidas por terpenos. Los terpenos pertenecen al grupo de hidrocarburos inodoros que contribuyen poco al aroma pero que actúan como base diluyente del aceite esencial. Los compuestos responsables al aroma de los aceites esenciales suelen ser sustancias que se encuentran en menor proporción que son los compuestos orgánicos con grupos funcionales como la cetona, alcohol, éster, aldehído, alcohol, éter, entre otros. Aunque estos son componentes minoritarios, su presencia y combinación en los aceites esenciales es primordial para que tengan su aroma característico (Laso, M., et al., 2018).

4.5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son extraídos de muestras vegetales mediante diversos métodos como: expresión, destilación por arrastre de vapor de agua, extracción con solventes volátiles, *enfleurage* y con fluidos supercríticos.

4.5.1 EXPRESIÓN

Consiste en que la muestra vegetal es exprimida para la liberación del aceite, este es recolectado y filtrado; este método es utilizado comúnmente para la extracción de esencias de cítricos (Martínez, 2001).

4.5.2 DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR DE AGUA

No requiere de tecnología sofisticada, la muestra es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua donde la esencia es arrastrada, condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa, técnica utilizada para esencias fluidas y utilizadas para perfumería (Martínez, 2001).

4.5.3 EXTRACCIÓN CON SOLVENTES VOLÁTILES

En este método la muestra es seca y molida ya que se pone en contacto con solventes como el alcohol, cloroformo, entre otras. Los solventes solubilizan la esencia, pero también extraen otras sustancias como grasas y ceras por lo cual se obtiene una esencia impura. Utilizada a escala laboratorio ya que a nivel industrial resulta costoso (Martínez, 2001).

4.5.4 ENFLORADO O ENFLEURAGE

Aplicado generalmente en flores, la muestra es puesta en contacto con un aceite vegetal que actúa como vehículo extractor y solubiliza la esencia, la mezcla de aceite esencial y vegetal es separada por otro medio fisicoquímico, técnica empleada para la obtención de esencias florales (Martínez, 2001).

4.5.5 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

La muestra es licuada o molida la cual es empacada en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra de un líquido supercrítico como por ejemplo bióxido de carbono líquido, las esencias son solubilizadas y arrastradas, el líquido supercrítico actúa como solvente extractor que luego es eliminado por descomposición progresiva hasta que finalmente se obtiene la esencia pura (Martínez, 2001).

4.6 DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR

Este método es el más común para la obtención de aceites esenciales, este proceso de separación consiste en que mediante el vapor de agua se vaporizan los componentes volátiles de la muestra vegetal. El método consiste en hacer pasar un flujo de vapor a través de la muestra de modo que se arrastra consigo los aceites esenciales, estos vapores se enfrían y condensan lo que da lugar al destilado líquido, estas se pueden separar por decantación gracias a la diferencia de densidad (Laso, M., et al., 2018).

Se distinguen tres tipos de destilación las cuales son: hidrodestilación o destilación con agua, destilación con agua y vapor y destilación en corriente de vapor, aunque son iguales

la diferencia radica en las variaciones de la práctica y de los resultados que se obtienen, las principales diferencias entre estos tipos son la disposición de la muestra vegetal y el lugar de producción del vapor de agua.

De los tres tipos la destilación en corriente de vapor es el método más utilizado a nivel industrial a causa de la sencillez del proceso y de los resultados positivos.

4.7 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL

Las bacterias patógenas se encuentran distribuidas en el ambiente, en animales, seres humanos, lo cual propicia a su propagación. El principal agente patógeno es la *Escherichia coli* que también es una bacteria patógena de carácter alimentario que provoca enfermedades gastrointestinales, su aparición es frecuente en la mala manipulación de alimentos.

El papel de los aceites esenciales en la inhibición de microorganismos patógenos ha ido tomando relevancia con el paso de los años, se ha vuelto tema de investigación en la industria alimentaria ya que resulta ser beneficioso para esta.

La composición química de los aceites esenciales está relacionada con su actividad antimicrobiana. Los aceites esenciales de los frutos cítricos se encuentran principalmente en la cáscara de la fruta, cuya extracción es económicamente sostenible porque la cáscara representa una pérdida para la industria de jugos. El interés de estos como agentes antimicrobianos y conservantes abre una posible alternativa para sustituir los conservadores y antibióticos convencionales utilizados en la industria alimentaria (Canche, 2022).

Gracias a las investigaciones respecto a la inhibición microbiana y a los resultados positivos es que se ha podido demostrar que los aceites esenciales extraídos de los cítricos si contienen acción inhibidora sobre diversos microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter*, *Enterococcus fecalis*, *Vibrio parahemolyticus*, *Listeria monocytogenes* y otros.

Las investigaciones se han enfocado en la extracción de aceites esenciales de cítricos como alternativas antimicrobianas porque hacen énfasis en los componentes que los constituyen, específicamente en el quimiotipo limoneno.

CAPÍTULO V JUSTIFICACIÓN

En la industria alimentaria la contaminación de alimentos por microorganismos patógenos es un problema que se ha presentado desde hace mucho tiempo atrás, por lo que buscar las formas de combatirlo ha resultado en la resistencia que tienen estos microorganismos a los antibióticos con los que se suelen tratar para su inhibición.

En los últimos años se ha implementado la búsqueda de soluciones en base a componentes naturales que tengan la misma eficiencia que los antibióticos o incluso que sean mejores. Diversos estudios realizados demuestran la inhibición de microorganismos patógenos por medio de los aceites esenciales de algunas cáscaras de cítricos como la mandarina, limón y la naranja. En el estado de Campeche se encuentran arboles de injerto del limón dulce, fruta que no ha sido investigada ni tratada a profundidad por lo que es una oportunidad para realizar el estudio y analizar los datos respecto a la actividad antimicrobiana de sus aceites esenciales.

Esta investigación beneficiaria a la industria alimentaria de obtener resultados positivos se habrá encontrado un nuevo compuesto natural para inhibir microorganismos patógenos haciendo uso de cáscaras del limón dulce que usualmente son desechadas, pues se consideran un desecho sin valor comercial. La utilidad de esta investigación además de los datos que se obtendrán será hacer uso del limón dulce, fruta que crece en el estado y que no ha sido estudiada.

CAPÍTULO VI OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Inhibir microorganismos patógenos mediante los aceites esenciales extraídos de las cáscaras del limón dulce campechano.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extraer aceites esenciales de las cáscaras de limón dulce mediante destilación por arrastre de vapor.
2. Realizar la caracterización fisicoquímica y antioxidante del aceite esencial extraído.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial extraído de la cáscara de limón dulce en cepas aisladas de *Escherichia coli*.

CAPÍTULO VII MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 METODOLOGÍA GENERAL DEL PROCESO

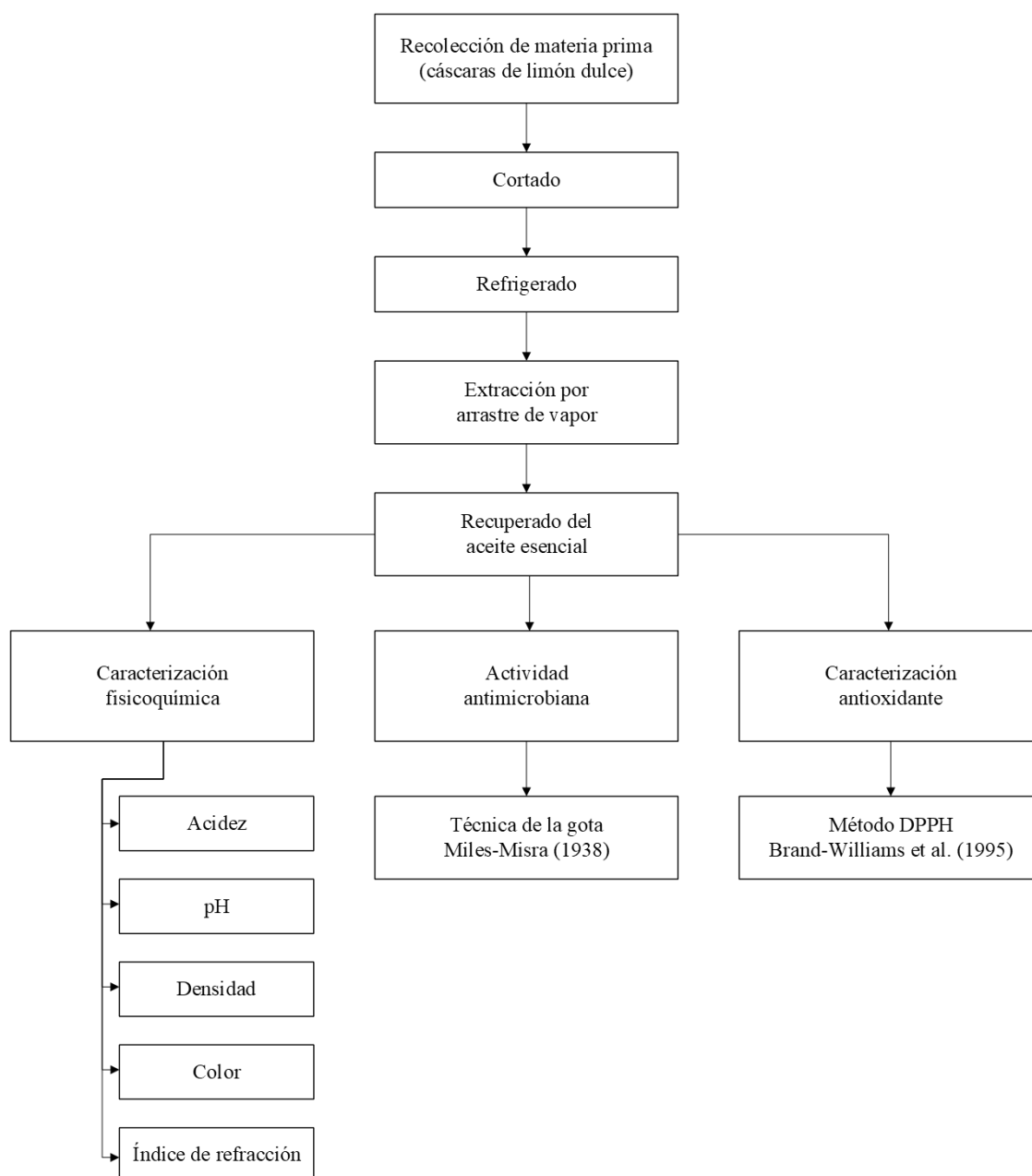


Figura 1 Diagrama general del proceso.

7.2 OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La materia prima utilizada fueron las cáscaras de limón dulce obtenidas de la localidad de San Antonio Sahcabchén en el municipio de Dzitbalché, Campeche; a finales del mes de septiembre de 2024.



Figura 2 Limón dulce.

7.3 OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL POR ARRASTRE DE VAPOR

Este procedimiento se realizó en el laboratorio de Análisis Químico-Biológicos del ITESCAM los primeros días del mes de octubre debido a que se esperó la maduración comercial del fruto para poder obtener las cáscaras.

La obtención del aceite esencial se realizó por medio del método de destilación por arrastre de vapor con un equipo armado (Anexo 1). Se cortó la cascara del limón dulce en pedazos pequeños y se resguardo en el congelador en un tiempo de mínimo 1 hora para después ser usado para la extracción. Este procedimiento se realizó siete veces, en un lapso de 3hrs cada extracción.

7.4 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN DULCE

Se realizaron las pruebas fisicoquímicas básicas para obtener más datos acerca del aceite esencial del limón dulce, estos análisis nos ayudaron a comprender mejor el comportamiento con respecto a las pruebas antimicrobianas.

7.4.1 ACIDEZ

Esta prueba se realizó mediante el método de acidez titulable, la muestra fue el aceite esencial de limón dulce en concentración pura, se utilizó una concentración de hidróxido de sodio 0.01 N (NaOH), como indicador fenolftaleína al 1%. Se realizaron 3 repeticiones para tener un promedio, se agregaron 5ml del aceite esencial con dos gotas del indicador agitando suavemente para mezclar la solución. En una bureta se 25ml se colocó el hidróxido de sodio y se fue dejando caer gota a gota manteniendo en constante agitación el matraz hasta que cambio de color, se anotaron los datos del gasto de NaOH para hacer los cálculos de acidez titulable (Jimenez et al, 2024).

7.4.2 pH

Para medir el pH del aceite esencial se hizo uso del potenciómetro el cual se calibró con agua antes de medir el pH de la muestra, después de calibrarlo se introdujo en electrodo en la muestra por unos minutos hasta que indicara el valor del pH, se realizaron tres repeticiones para obtener un promedio.

7.4.3 ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Para calcular este primero se midieron los grados Brix en un refractómetro digital el cual se calibró primero con agua, después se colocó la muestra para medir los grados Brix, se realizaron 3 repeticiones para tener un resultado más seguro. A partir de los grados Brix medidos y obtenidos se buscó una tabla de equivalencias para conocer el índice de refracción (ATAGO, 2024).

7.4.4 DENSIDAD

Para medir este parámetro se aplicó la fórmula de densidad ($d=m/v$), se pesó un vaso de precipitado vacío de 250ml, con una pipeta se midieron 5ml del aceite esencial de limón dulce y se colocó en el vaso de precipitado, después se pesó en una balanza. Se realizaron 3 repeticiones y se anotaron todos los datos para después aplicar la formula.

7.4.5 COLOR

Para esta prueba se hizo uso de un colorímetro digital el cual arrojó los datos de L, a y b. El color fue evaluado mediante la determinación del índice de color (IC), en donde L, a y b son los parámetros del sistema color CIELAB. En donde el parámetro de L proporciona el valor de la luminosidad o brillo de la muestra, el parámetro a indica la zona de variación entre el rojo y verde del espectro, en cuanto al parámetro b este se refiere a la zona de variación entre el amarillo y el azul. El (IC) puede utilizarse como variable de control de la calidad organoléptica de alimentos (Vignoni et al., 2006).

7.5 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

7.5.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Se prepararon los medios de cultivo para el crecimiento de bacterias patógenas en caldo verde bilis brillante 80ml de agua con 3.2gr del caldo y del caldo Lauril sulfato, 80ml de agua con 2.8gr del caldo. Con respecto al agar Mac Conkey se preparó 250ml de agua con 12.5gr del agar y del agua peptonada se preparó 10ml con 1g de peptona siendo una concentración de 1:10.

Cada tubo de ensayo contenía 12ml de caldo, 6 tubos con caldo verde bilis brillante y 6 tubos con caldo Lauril sulfato, además de que en el interior de cada tubo de ensayo se colocó una campana Durham.

7.5.2 ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se lavó todo el material a utilizar antes de meterlos a la cesta del autoclave, se introdujeron los tubos de ensayo que contenían caldo verde bilis brillante y el caldo Lauril sulfato, el matraz con el agar Mac Conkey preparado, cajas Petri, un mortero de porcelana con su pistilo, puntas para la micropipeta, el agua peptonada y los hisopos para evitar cualquier contaminación no deseada y poder crecer la bacteria deseada.

7.5.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La bacteria *Escherichia coli* fue obtenida del cilantro (del mercado en el municipio de Dzitbalché, Campeche, en noviembre de 2024), para ello se pesó 1gr de cilantro para después macerarlo en el mortero antes de introducirlo al agua peptonada, del agua peptonada se tomó 1ml y se colocó en el primer tubo de ambos caldos para después hacer la dilución de 1 a 6 de cada caldo respectivamente, se dejó incubar a temperatura ambiente.

7.5.4 CRECIMIENTO DE LA BACTERIA ESCHERICHIA COLI EN CALDO LAURIL SULFATO

Para realizar el proceso de inhibición primero se aisló la bacteria, el uso del caldo lauril sulfato este caldo sirvió para la identificación de enterobacterias presentes en la muestra de cilantro. Se prepararon 6 tubos de ensayo a los cuales se les agregó una campana de Durham en el interior. En cada tubo se colocaron 12ml del caldo, al primer tubo se le agregó 1ml de la muestra previamente preparada (1gr de cilantro en 10ml de agua peptonada 1:10), el tubo se agitó suavemente para mezclar la solución con el caldo, luego del primer tubo se tomó 1ml para agregarlo al segundo tubo para hacer la dilución hasta terminar con el tubo 6. Luego de realizar las diluciones estas se dejaron incubar a temperatura ambiente por tres días.

7.5.5 CRECIMIENTO DE LA BACTERIA ESCHERICHIA COLI EN CALDO VERDE BILLIS BRILLANTE

Se realizó la preparación del caldo verde bilis brillante para la identificación de la bacteria *Escherichia coli* debido a que este medio es un medio selectivo en el que únicamente crece la bacteria deseada para esta prueba. Se prepararon 6 tubos de ensayo a los cuales se les agregó una campana de Durham en el interior. En cada tubo se colocaron 12ml del caldo, al primer tubo se le agregó 1ml de la muestra previamente preparada (1gr de cilantro en 10ml de agua peptonada 1:10), el tubo se agitó suavemente para mezclar la solución con el caldo, luego del primer tubo se tomó 1ml para agregarlo al segundo tubo para hacer la dilución hasta terminar con el tubo 6. Luego de realizar las diluciones estas se dejaron incubar a temperatura ambiente por tres días.

7.5.6 SIEMBRA DE BACTERIA ESCHERICHIA COLI EN AGAR MAC CONKEY

Para la siembra en la caja Petri se utilizó el tubo 5 de las diluciones del agar verde bilis brillante, la muestra se tomó con un hisopo estéril, se pasó el hisopo por todo el agar con movimientos verticales y horizontales sin dañar el agar, la siembra de la bacteria se realizó con un mechero encendido con la caja Petri lo más cerca posible para evitar cualquier tipo de contaminación no deseada.

7.5.7 TÉCNICA DE LA GOTA MILES-MISRA

Para desarrollar esta técnica se usó una caja Petri con agar previamente sembrada con la bacteria, esta caja se dividió en 4 partes las cuales se numeraron del 1 al 4, en el primer cuadrante se colocó 50µl de agua estéril, en el segundo cuadrante 50µl del antibiótico preparado (Amoxicilina), para los cuadrantes 3 y 4 se agregó 100 µl del aceite esencial de limón dulce. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 4 días.

7.6 CARACTERIZACIÓN ANTIOXIDANTE

Se aplicó el método del radical DPPH empleando la metodología de (Brand-Williams et al., 1995), con el ligero ajuste en la longitud de onda ya que el método se aplica con la longitud de onda de 515nm, pero para esta prueba se modificó a 517nm. Se realizó la lectura inmediata y al minuto 30 para cada una de las 3 muestras. Cada muestra contenía 100µl del aceite esencial de limón dulce y 900µl del radical; el valor de referencia del DPPH en la lectura inmediata fue de 0.9224, el valor de referencia en el minuto 30 fue de 0.8774.

CAPÍTULO VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN DULCE

En la primera etapa del proyecto que es la extracción del aceite esencial de la cáscara de limón dulce se realizaron 3 extracciones por el método de destilación por arrastre de vapor. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 1 Resultados obtenidos de las tres extracciones.

Extracción	Peso de muestra	Tiempo	Rendimiento
1ra	100g	3hrs	0.5%
2da	130g	3hrs	26.19%
3ra	115g	3hrs	21.86%

En la tabla se observa que la segunda extracción es la que muestra mejores resultados, las tres extracciones se realizaron en un tiempo igual, las variaciones en cuanto a la segunda y tercera extracción se deben a la cantidad de muestra, con respecto a la primera no se muestra un resultado favorable, pero fue debido a causa de la ejecución del método en el que no se tenía una temperatura constante y había una fuga de vapor.

Sin embargo, se requieren más extracciones para coleccionar una mayor cantidad de aceite y poder realizar las caracterizaciones del mismo, a nivel fisicoquímico e inhibitorio de bacterias. De igual forma, más repeticiones de esta extracción, estandarizarán el rendimiento del aceite obtenido.

Se continuó realizando las extracciones del aceite esencial utilizando el mismo equipo y cantidades similares de la cáscara del limón dulce para tener más muestra del aceite ya que se requiere para la caracterización fisicoquímica y la inhibición de bacterias.

Tabla 2 Segunda parte de la realización de extracciones.

Extracción	Peso de muestra	Tiempo	Rendimiento
4ta	130g	3hrs	14.41%
5ta	122g	3hrs	15.69%
6ta	151g	3hrs	23.25%
7ma	138g	3hrs	12.45%

Con base a los nuevos resultados se notan las variaciones del rendimiento del aceite debido al peso de las cáscaras colocadas en el matraz con capacidad de 500ml, en la 7ma extracción se nota la disminución del rendimiento con respecto a la 4ta y 5ta que tienen pesos más bajos, pero con un poco mayor en cuanto al rendimiento. En el caso de la 6ta extracción el peso fue mayor a todas las extracciones.

En cada una de las extracciones se hizo uso de dos limones, se les retiró la cascara y se pesaba para posteriormente realizar los cálculos, el peso total de cáscara de limón dulce fue de 886g, se extrajo una cantidad de 149.9g de aceite esencial por lo cual el rendimiento total fue de 16.91%.

8.2 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL

Con la extracción del aceite esencial de las cáscaras de limón dulce por arrastre de vapor se obtuvo un rendimiento del 16.91%. Al realizarse las pruebas fisicoquímicas del AE se obtuvieron los datos presentados en la tabla 3.

Tabla 3 Parámetros fisicoquímicos del AE de limón dulce.

Parámetro	Resultado
Acidez	0.0017%
pH	6.24
Índice de refracción	1.33 nD
Densidad	0.996 g/cm ³
Color	-4.162 IC*

8.2.1 Acidez

De acuerdo con el resultado obtenido en este parámetro se comparó con resultados de estudios realizados a cítricos y estos pueden variar de acuerdo con la materia prima, al tipo, condiciones climatológicas, grado de madurez, entre otros, se toma en cuenta que el aceite esencial fue obtenido a partir de la cascara del limón dulce, es decir un desperdicio. Se tomó el valor del factor del cítrico anhidrido para aplicar la fórmula para calcular el porcentaje de acidez (ver Anexo 4).

8.2.2 pH

El resultado del pH del AE fue de 6.24 que en comparación de otros cítricos es un valor inferior a los reportados en diversos estudios realizados en mandarina y limón, sin embargo, no alcanza un valor neutro ya que se trata de un cítrico que no es muy ácido.

8.2.3 Índice de refracción

A partir del resultado obtenido de los grados Brix que fue de 0% se deduce que al ser un aceite esencial es correcto que no contenga azúcares, se buscó una tabla de equivalencias para conocer el índice de refracción, la imagen muestra la tabla de equivalencias en donde al ser 0 el valor de los grados Brix se le asigna el índice de refracción de 1.33299 (ATAGO, 2024).

%	n _D ²⁰	%	n _D ²⁰	%	n _D ²⁰	%	n _D ²⁰	%	n _D ²⁰
0	1.33299	20	1.36384	40	1.39986	60	1.44193	80	1.49071
1	1.33442	21	1.36551	41	1.40181	61	1.44420	81	1.49333
2	1.33586	22	1.36720	42	1.40378	62	1.44650	82	1.49597
3	1.33732	23	1.36889	43	1.40576	63	1.44881	83	1.49862
4	1.33879	24	1.37060	44	1.40776	64	1.45113	84	1.50129
5	1.34026	25	1.37233	45	1.40978	65	1.45348	85	1.50398
6	1.34175	26	1.37406	46	1.41181	66	1.45584	86	1.5067
7	1.34325	27	1.37582	47	1.41385	67	1.45822	87	1.5094
8	1.34477	28	1.37758	48	1.41592	68	1.46061	88	1.5122
9	1.34629	29	1.37936	49	1.41799	69	1.46303	89	1.5149
10	1.34782	30	1.38115	50	1.42009	70	1.46546	90	1.5177
11	1.34937	31	1.38296	51	1.42220	71	1.46790	91	1.5205
12	1.35093	32	1.38478	52	1.42432	72	1.47037	92	1.5234
13	1.35250	33	1.38661	53	1.42647	73	1.47285	93	1.5262
14	1.35408	34	1.38846	54	1.42863	74	1.47535	94	1.5291
15	1.35568	35	1.39032	55	1.43080	75	1.47787	95	1.5320
16	1.35729	36	1.39220	56	1.43299	76	1.48040		
17	1.35891	37	1.39409	57	1.43520	77	1.48295		
18	1.36054	38	1.39600	58	1.43743	78	1.48552		
19	1.36218	39	1.39792	59	1.43967	79	1.48811		

Figura 3 Tabla de equivalencias entre el valor Brix (%) y el índice de refracción (nD).

8.2.4 Densidad

El resultado obtenido en la densidad del AE fue de 0.99635 g/ml muy cerca del valor referente del agua que es de 0.99820g/cm³, otros estudios reportan datos similares en la densidad de aceites esenciales.

8.2.5 Color

De acuerdo con el sistema CIELAB para medir el color se obtienen los valores de L, a y b. En la tabla 3.6 se muestran los valores obtenidos de cada parámetro.

Tabla 4 Valores de los parámetros L, a y b.

Parámetros	Resultado
L	30.675 ± 0.855
a	0.605 ± 0.190
b	-0.475 ± 0.049

El valor de L indica la luminosidad o brillo que al ser un resultado positivo significa que tiene luminosidad, el valor de a indica que esta ligeramente inclinado a los tonos rojos y el valor de b al ser negativo indica colores en la dirección azul.

Tomando esos valores del promedio como referencia de parámetros se aplicó la fórmula para conocer el índice de color (ver Anexo 5). El valor de índice de color del AE del limón dulce fue de -4.162359781 que de acuerdo con la tabla de referencias se valor se relaciona a los colores que van del verde profundo al verde amarillento.

8.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

8.3.1 CRECIMIENTO DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI* EN CALDO LAURIL SULFATO

Al pasar el tiempo de incubación los tubos presentaron cambio de color, las diluciones se realizaron correctamente ya que se apreciaba que en el tubo 1 presentaba mayor turbidez, la degradación fue notoria y el tubo 6 apenas tenía crecimiento. Este resultado indicó la presencia de enterobacterias. En la figura 3.1 se observa el cambio de color de las diluciones.

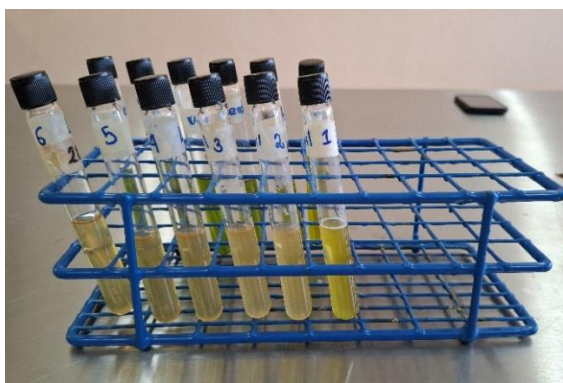


Figura 4 Diluciones en caldo lauril sulfato.

8.3.2 CRECIMIENTO DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI* EN CALDO VERDE BILLIS BRILLANTE

En los tubos del caldo verde bilis brillante también se visualizó el cambio de color el tubo más turbio fue el 1 y el que menos turbidez presentaba fue el tubo 6, en el caso de estos tubos como el caldo verde bilis brillante es un medio selectivo únicamente crece la bacteria *Escherichia coli* que es la bacteria deseada para realizar la prueba. La figura 3.2 muestra el resultado de las diluciones.

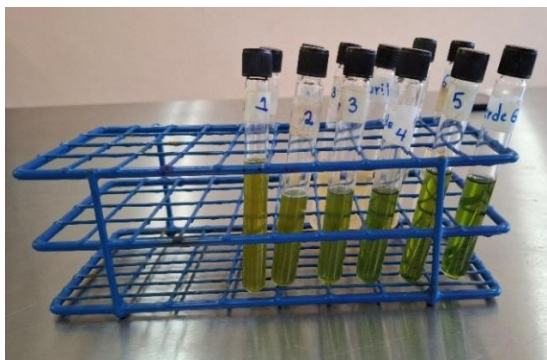


Figura 5 Diluciones en caldo verde bilis brillante.

8.3.3 INHIBICIÓN BACTERIANA CON TÉCNICA DE LA GOTA MILES-MISRA

Para la siembra de la bacteria se usó el tubo 5 que era el más diluido, pero con presencia de *Escherichia coli*, se colocaron las concentraciones correspondientes en los cuadrantes.



Figura 6 Siembra de la bacteria con hisopo y técnica de la gota (Miles-Misra).

Al día siguiente de la siembra pasando las 22 horas se revisó la caja en donde se observó el crecimiento de la bacteria, pero también la inhibición de esta en el cuadrante dos donde se colocó el antibiótico (Amoxicilina), en el cuadrante 3 y 4 donde se agregó el aceite esencial de limón dulce se pudo observar una coloración diferente en el centro de cada cuadrante donde se agregó la concentración de 100µl del aceite, por lo que representó un efecto retardador en el crecimiento de la bacteria.

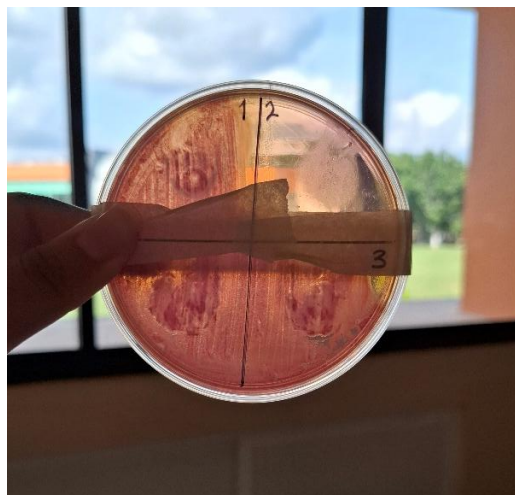


Figura 7 Inhibición bacteriana 1 día después de la siembra.

Se dejaron pasar 4 días y cuando se revisó nuevamente la caja se observó la formación de los halos de inhibición y el cambio total de color amarillo en el agar anteriormente rojo, por lo que se obtuvieron resultados positivos de la prueba.

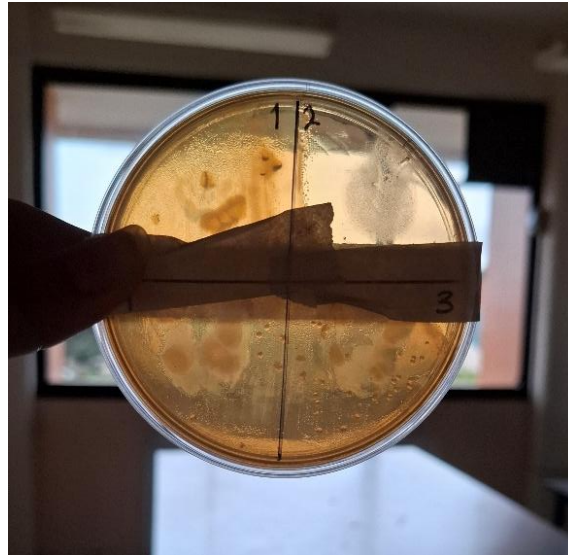


Figura 8 Inhibición bacteriana 4 días después de la siembra.

8.3.4 TAMAÑO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

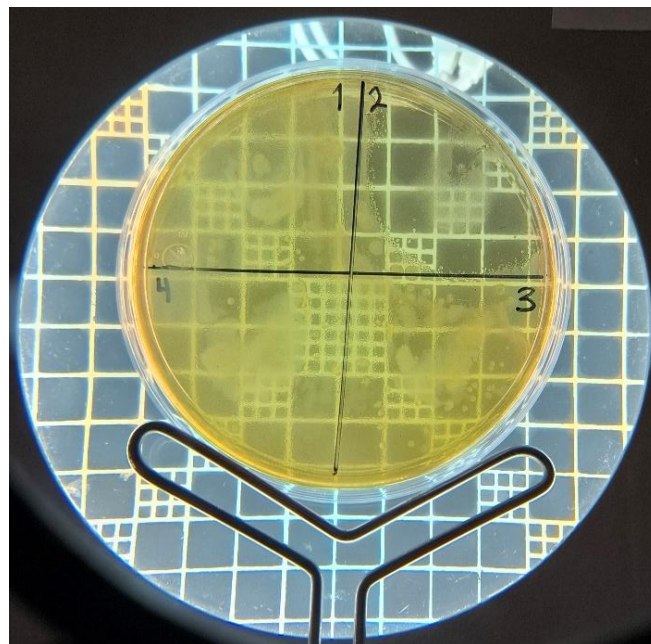


Figura 9 Halos de inhibición del aceite esencial de limón dulce.

Con una regla se midieron los halos de inhibición en ambos cuadrantes en donde se agregó los 100 μ l del aceite esencial, en el cuadrante 3 el halo de inhibición midió 0.7cm y en el cuadrante 4 el halo de inhibición tenía una medida de 0.5cm.

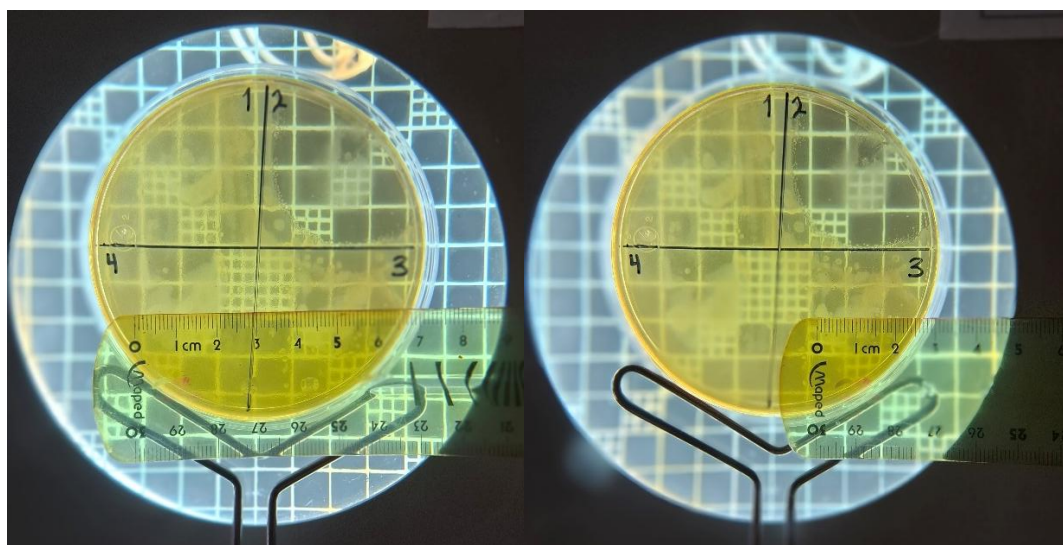


Figura 10 Medición de los halos de inhibición del aceite esencial de limón dulce.

Con este resultado se corroboró la actividad inhibitoria de bacterias de los aceites esenciales de los cítricos siendo este caso el del limón dulce un injerto de la localidad de San Antonio, Dzitbalché, Campeche.

8.5 CARACTERIZACIÓN ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN DULCE

La técnica empleada para evaluar la actividad antioxidante fue la del DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) por lo simple que es y por su aplicación para la actividad antioxidante de AE de cítricos. En la tabla 3.3 se muestran los datos de la absorbancia de cada muestra leída al minuto 0 y al minuto 30, tomando como referencia la absorbancia control del DPPH al minuto 0 con un valor de 0.9224

Las lecturas de las muestras mostraron similitud entre ellas leídas al mismo minuto, pero la absorbancia en el minuto 0 y en el minuto 30 si tomaron ligera diferencia, pero ninguna sobrepasó el valor de la absorbancia control del DPPH.

Tabla 5 Porcentaje de inhibición de la muestra al minuto 0 y al minuto 30.

Muestra	% de inhibición en el min 0	% de inhibición en el min 30
Aceite esencial de limón dulce	12.19 ± 0.13	18.07 ± 0.04

Los resultados con respecto a los porcentajes de inhibición son positivos en cuanto a las lecturas del minuto 30 ya que aumenta un 6% con respecto a las de lectura inmediata.

El promedio de porcentaje de inhibición en el minuto 0 es de 12.19%, el promedio de porcentaje de inhibición en el minuto 30 es de 18.07%. Con estos datos también se obtuvo la desviación estándar de las muestras, en el minuto 0 la desviación es de 0.13 y en el minuto 30 es de 0.04.

CAPÍTULO IX CONCLUSIÓN

Con base a los objetivos inicialmente planteados de esta investigación y de acuerdo con los resultados obtenidos se llegó a estas conclusiones:

El aceite esencial de limón dulce obtenido por medio de destilación por arrastre de vapor contiene características similares con respecto a otros cítricos que hicieron que se pudiera realizar la prueba de inhibición por su contenido de antioxidantes y por sus propiedades fisicoquímicas.

Varios trabajos similares han demostrado la eficiencia de los aceites esenciales como inhibidores de microorganismos patógenos tal como fue el este caso de este estudio con el aceite esencial obtenido de las cascaras de limón dulce un injerto presente en el estado de Yucatán y Campeche.

Para entender el comportamiento del aceite esencial sobre la bacteria *Escherichia coli* fue necesario realizar los análisis fisicoquímicos, así como también hacer varias pruebas hasta obtener las concentraciones adecuadas y los demás parámetros para que el AE pudiera actuar de la manera deseada.

Cabe mencionar que este es el inicio del uso del limón dulce en el aspecto microbiológico, por lo que se necesita de más investigación, aplicación y uso de otros métodos para lograr una mejor eficiencia del aceite esencial.

CAPÍTULO X RECOMENDACIONES

En cuanto a las recomendaciones fue necesario realizar varias extracciones por arrastre de vapor para tener el suficiente aceite esencial para todas las pruebas que se tenían que realizar con este, además de que se procuró que el aceite saliera lo más puro posible sin presencia de agua que pudiera afectar el efecto inhibidor, para obtener buenos resultados en la inhibición de la bacteria se tuvieron que realizar varias pruebas debido al ajuste en la concentración del aceite esencial ya que al ser una concentración alta fue necesario dividir en partes la concentración total al momento de realizar la aplicación en el agar, así como también hacer el uso de diluciones para tener la menor cantidad de microorganismos y que el aceite pudiera actuar de forma correcta.

CAPÍTULO XI REFERENCIAS

- ATAGO CO.,LTD. *Refractómetro Libro de datos-Índice de Refracción y Brix* | ATAGO CO.,LTD. (2024). Atago.net.
- Bedoya-Cataño, J. F., Ramón-Palacio, C., Gil-Garzón, M. A., & Ramírez-Sánchez, C. (2022). Extracción de antioxidantes de los arándanos (*Vaccinium corymbosum*): efecto de solventes verdes sobre polifenoles totales, capacidad antioxidante y comportamiento electroquímico. *TecnoLógicas*, 25(53), e2277–e2277.
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier y C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LebensmittelWissenschaft und Technologie*: 28(1), 25-30 (1995).
- Canche, F. (2022). “INHIBICIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS CON ACEITES ESENCIALES DE MANDARINA”. 44p.
- De Silva, A,. (2015). Determinación de la actividad antibacteriana de tres variedades de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck, *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación con *Citrus reticulata* y *Citrus medica* L.) Frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Universidad, Ciencia Y Sociedad*, 30.
- Del Carpio Jiménez, C., Urrunaga Ormachea, M., Gutierrez Chavez, R. G., & Tomaylla Cruz, C. (2022). PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus jambhiri* (Limón rugoso). *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 88(3).
- Domínguez, E. & Ordóñez, E. (2014). EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, VITAMINA C DE ZUMOS CÍTRICOS DE LIMA DULCE (*Citrus limetta*), LIMÓN TAHITÍ (*Citrus latifolia*), LIMÓN RUGOSO (*Citrus jambhiri* Lush) Y MANDARINA CLEOPATRA (*Citrus reshni*) ALMACENADOS EN REFRIGERACIÓN, 3 (1): 30-35. Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agrarias de la Selva (UNAS), Tingo María - Perú.
- Granados, C., Yáñez, X., & Acevedo, D. (2014). Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Myrcianthes leucoxyla* de Norte de Santander (Colombia). *Información Tecnológica*, 25(3), 11–16.

- Guerra Ordóñez, M., Rodríguez Jorge, Mayra, García Simón, Gastón, & Llerena Rangel, Celia. (2004). Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 9(2).
- Guerra Ordóñez, Marta, Jorge, R., García Simón, Gastón, & Rangel, L. (2024). Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 9(2).
- Jennifer, PEREA V, Aidé, & STASHENKO, E. E. (2024). Obtención de aceites esenciales y pectinas a partir de subproductos de jugos cítricos. *Vitae*, 16(1), 110–115.
- Jimenez, L., Cujilema, C., Villacres, S., & Chuín, G. (2024). Determinación de la Acidez Titulable en Cítricos Amazónicos: Correlación con la Madurez y la Susceptibilidad a la Pudrición. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, Ciudad de México, México. ISSN 2707-2215. Volumen 8, Número 2.
- Kim, D.-O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3713–3717.
- Konica Minolta Sensing (2020, March 24). *Entendiendo El Espacio de Color CIE L*A*B**.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726–732.
- Laso, M., Nieves, C., & Aguilar, J. (2018). Irene Casado Villaverde. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES POR DESTILACIÓN EN CORRIENTE DE VAPOR. 85p.
- Manuel, R., Guillen-Morales, M. M., & Ceh-Ac, C. A. (2022). Microtitulación para la determinación de la acidez titulable de té (Camellia sinensis). *RIDE Revista Iberoamericana Para La Investigación Y El Desarrollo Educativo*, 12(24).
- Martínez, A. (2001). UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA ACEITES ESENCIALES. ACEITES ESENCIALES p1.

- Martínez, J., de, S., Ojeda, Ferrer, A., & Nava, R. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 20(4), 502–512.
- Miles AA, Misra SS, Irwin JO. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg (Lond)*. 1938 Nov;38(6):732-49. doi: 10.1017/s002217240001158x. PMID: 20475467; PMCID: PMC2199673.
- Miles_and_Misra_method. (2025). Bionity.com.
- Montero, Y. (2009) Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón persa (Círus latífoia Tanaka). UNIVERSIDAD VERACRUZANA INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS. 71p.
- Orduz-Rodríguez, J. O. & Mateus-Cagua, D. M. (2012). Generalidades de los cítricos y recomendaciones agronómicas para su cultivo en Colombia. En: Cítricos: Cultivo, Postcosecha e Industrialización (pp. 49 - 88). Corporación Universitaria Lasallista.
- RAE, & RAE. (2024, January 19). *Diccionario de la lengua española (2001) RAE - ASALE*. “Diccionario de La Lengua Española (2001).”
- Torrenegra-Alarcón, N.P. Pájaro, G. León-Méndez (2017). Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm*, 46 (2), 160-175.
- Vignoni, L. A., Césari, R. M., Forte, M., & Mirábile, M. L. (2006). Determinación de Índice de Color en Ajo Picado. *Información Tecnológica*, 17(6).

CAPÍTULO XII ANEXOS

ANEXO 1 Obtención de aceite esencial por arrastre de vapor.

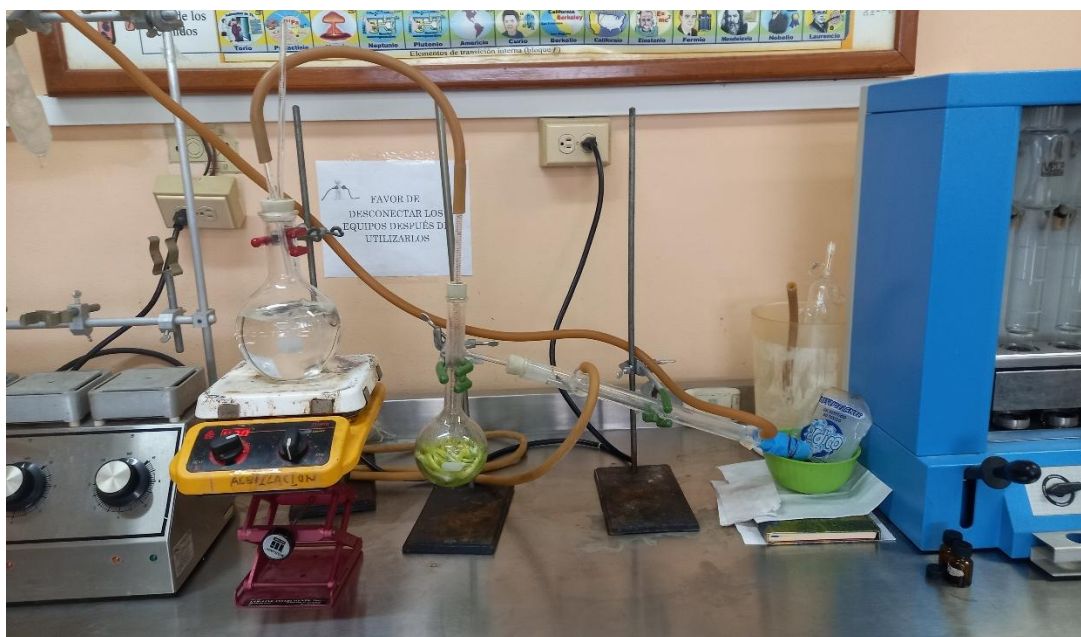


Figura 11 Equipo armado de destilación por arrastre de vapor.

ANEXO 2 Frascos del aceite esencial.



Figura 12 Frascos con el aceite esencial obtenido.

ANEXO 3 Muestra para el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*.



Figura 13 Muestra de cilantro.

ANEXO 4 Calculo de acidez titulable.

$$\% \text{acidez en frutos} = \frac{\text{ml NAOH} \times N(\text{NAOH}) \times \text{factor} \times 100}{\text{g o vol de jugo ml de muestra titulada}}$$

Tabla 1: Factor de algunos acidos de las frutas

Acido	Factor
Málico	0,067
Orálico	0,045
Cítrico anhidro	0,064
Tartárico	0,075
Acético	0,06
Láctico	0,9

Fuente: Norma Oficial Mexicana NOM-FF-6-1982

Figura 14 Fórmula para calcular acidez y tabla de factor de algunos ácidos de las frutas.

ANEXO 5 Índice de color.

$$IC^* = \frac{a \cdot 1000}{L \cdot b}$$

- a) Si IC* es negativo (-40 a -20), su valor relaciona los colores que van desde el azul-violeta al verde profundo.
- b) Si IC* es negativo (-20 a -2), su valor relaciona los colores que van del verde profundo al verde amarillento.
- c) Si IC* está entre -2 a +2, representa el amarillo verdoso.
- d) Si IC* es positivo (+2 a +20), se relaciona con los colores que van desde el amarillo pálido al naranja intenso.
- e) Si IC* es positivo (+20 a +40), se relaciona con los colores que van desde el naranja intenso al rojo profundo.

Figura 15 Fórmula para calcular el índice de color (IC), interpretación de los resultados del (IC).

ANEXO 6 Sistema CIELAB.

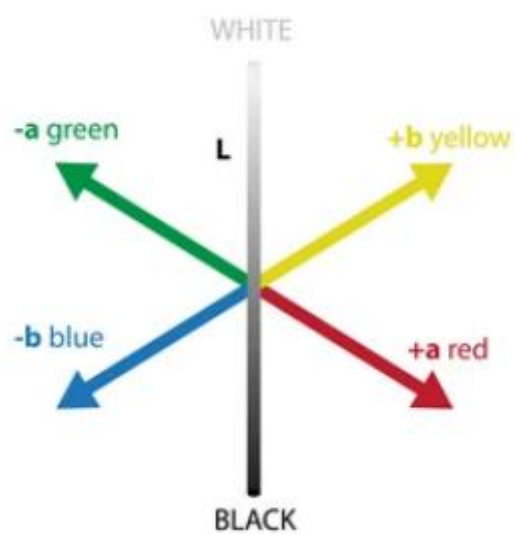


Figura 16 Representación de L, a y b en el sistema CIELAB.