

IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Naranja

La naranja es un fruto cítrico de nombre científico *Citrus sinensis*, que consta de varios carpelos o gajos fáciles de separar, cada uno de los cuales contiene una pulpa de color variable entre el anaranjado y el rojo, jugosa y succulenta; además posee varias semillas y numerosas células jugosas, cubiertas por un exocarpo coriáceo o cáscara de color anaranjado cuyo interior es blanco, que contiene numerosas glándulas llenas de aceites esenciales. Se consume como fruta fresca, en jugo y enlatados; igualmente se utiliza para elaborar mermelada y para la obtención de aceites esenciales de la cáscara (SAGARPA, 2009).

La naranja es la fruta que más se produce en el mundo, alcanzando volúmenes cercanos a 80,000,000 toneladas (Siller, 1998). De acuerdo con la FAO (2009) la naranja ocupa el quinto lugar en producción en México, ubicando a este país en la cuarta posición a nivel mundial en producción de dicho cítrico, ya que en 2008 se produjeron 4,306,633 toneladas. Los principales estados productores de Naranja en orden de importancia: Veracruz, que representa una participación del casi el 50% de la producción nacional, San Luis Potosí, Tamaulipas y Puebla (SAGARPA, 2009).

Como se ha dicho, la naranja se produce de manera abundante en México y por ende, su consumo dentro del mismo es elevado. Por otro lado, se ha especificado que el aceite esencial que se extrae de la cáscara de la misma posee ciertos niveles de actividad antimicrobiana

(Viuda-Martos et al., 2008; Fisher y Phillips, 2008), lo que la hace atractiva para la extracción y estudio de dicho aceite, pudiendo incluso dar lugar a un mayor aprovechamiento del abundante desecho que significa la cáscara de la naranja.

4.2 Mohos en alimentos

Los mohos son hongos filamentosos que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se ven frecuentemente sobre pan viejo, queso o frutas. Cada filamento, denominado hifa, crece fundamentalmente en el extremo por un mecanismo de extensión celular. Las hifas crecen en masa en lo que se denomina micelio, que puede verse fácilmente sin ayuda del microscopio (Madigan *et al.*, 1999).

La producción de esporas es característica de los hongos en general. Una espora es una unidad diminuta y simple, que se propaga sin un embrión y que sirve para la producción de un nuevo individuo de la misma especie (Jay, 1996). Estas pueden transportarse por agua, aire o insectos y proporcionan al moho el color que se aprecia (USDA, 2005).

Las paredes celulares de los mohos maduros son extremadamente rígidas, resistiendo los ataques enzimáticos y protegiendo al protoplasto del daño por condiciones extracelulares. Pueden tolerar grandes diferencias en presiones osmóticas (Moreno, 2002).

Los mohos, al igual que otros organismos, absorben los materiales externos a través de sus membranas, transportándolos a los sitios metabólicos dentro del micelio, donde los transforman en energía para los procesos biosintéticos y de conservación. Se consideran tres regiones importantes: la pared celular, la membrana citoplásmica y la región comprendida entre ellas. Dichas regiones juegan un papel muy importante en el transporte de nutrientes que algunas veces pueden favorecer al moho y otras perjudicarlo, causando daño a la célula (Burnett, 1976).

De acuerdo con Frazier y Westhoff (1988) existen varios medios que pueden ser útiles para el cultivo de mohos, presentándose el crecimiento siempre en las siguientes fases:

1. Fase inicial o lag. El número de microorganismos permanece constante o puede disminuir. Esto puede deberse a un ajuste en su medio ambiente.
2. Fase logarítmica. Los microorganismos aumentan en número debido a un abundante suministro de alimento.
3. Fase de crecimiento negativo. La multiplicación comienza a decrecer a causa de la disminución en el suministro de nutrientes y la acumulación de productos de desecho, que pueden ser tóxicos para el organismo.

4. Fase estacionaria. Aquí la tasa de mortalidad se encuentra en equilibrio con la tasa de natalidad, lo cual se debe a la disminución de nutrientes y la acumulación de productos de desecho.

5. Fase de mortalidad acelerada. La tasa de mortalidad es mucho mayor; va en aumento conforme se agotan los nutrientes y la acumulación de productos de desecho es muy grande.

4.2.1 Importancia de los mohos en alimentos

Existen varios mohos que deterioran a los alimentos. Esto se debe en gran parte a su amplio intervalo de crecimiento, tanto de pH (2 a 8.5), como de temperaturas (10 a 35°C). Asimismo, los requerimientos de humedad para los mohos son relativamente bajos, ya que la mayoría de las especies pueden crecer a una a_w de 0.85 o menor (Moreno, 2002).

Los mohos crecen en los alimentos con una apariencia aterciopelada y algodonosa, algunas veces coloreada, siendo notorios a simple vista y dando así, un aspecto desagradable a los alimentos (Frazier y Westhoff, 1988). El moho presente en algunos alimentos puede ser parte del proceso de elaboración de los mismos, como en ciertos tipos de quesos; sin embargo, en otros casos, el alimento enmohecido es desechado por ser inadecuado para el consumo humano, ya que puede causar alergias o enfermedades.

Algunos hongos que crecen sobre materiales vegetales producen toxinas con efectos indeseables para plantas y animales. Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos con diferentes propiedades químicas, biológicas y toxicológicas, producidas por hongos toxigénicos que se desarrollan en productos vegetales. Estas sustancias provocan intoxicaciones conocidas como micotoxiosis (Ruiz y Front, 2007).

Elevados niveles de micotoxinas en la dieta pueden causar efectos adversos agudos y crónicos sobre la salud del hombre y de una gran variedad de especies animales, pudiendo afectar a distintos órganos, aparatos o sistemas; especialmente al hígado, riñón, sistema nervioso, endócrino o inmunitario (Ruiz y Front, 2007).

Debido a su bajo peso molecular, las micotoxinas suelen ser muy termorresistentes y pueden difundirse a grandes distancias en los alimentos (Martínez, 2008).

4.2.2 *Aspergillus flavus*

Dentro de los mohos de importancia en los alimentos se encuentran los del género *Aspergillus*; siendo de particular interés *Aspergillus flavus*, causante del deterioro de una amplia variedad de productos alimenticios como frutas y hortalizas, semillas, granos, etc.

Aspergillus flavus es un moho mesófilo que tiene un aspecto aterciopelado, algodonoso y de color verde (figura 1). Su temperatura óptima de crecimiento es 37°C, es capaz de crecer en

un rango de pH de 3.0 a 6.8 y su actividad de agua mínima varía de 0.8 a 0.9 (Banwart *et al.*, 1982).

Bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, estos mohos crecen en ciertos alimentos, dando como resultado la producción de micotoxinas, conocidas para este género como aflatoxinas; son compuestos tóxicos y cancerígenos. La contaminación más enunciada se ha encontrado en nueces, cacahuates y otras semillas oleaginosas, incluyendo maíz y algodón (Walderhaug, 2007).



Figura 1. Colonia de *Aspergillus flavus*
(Martínez, 2008)

4.3 Agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos son sustancias usadas para conservar los alimentos, previniendo el crecimiento de microorganismos y el subsecuente deterioro. Su función tradicional es prolongar la vida de anaquel y preservar la calidad a través de la inhibición de microorganismos deteriorativos. Sin embargo, los antimicrobianos se han utilizado de manera creciente, como

intervención primaria para la inhibición o inactivación de microorganismos patógenos en alimentos (Davidson *et al.*, 2005).

Los antimicrobianos se pueden clasificar en los compuestos presentes de manera natural en el producto o alimentos y los que son añadidos intencionalmente. Entre los aditivos antimicrobianos directos aprobados para ser incorporados en los alimentos están los ácidos orgánicos y sus derivados, ésteres, nitritos, nitratos, entre algunos otros. Mientras que los antimicrobianos indirectos son sustancias que se añaden con otros objetivos a los de inhibir algún microorganismo en particular, pero que por su condición química inhiben a algún microorganismo; entre ellos se encuentran los fosfatos, antioxidantes fenólicos o el EDTA (Davidson *et al.*, 2005).

4.3.1 Modo general de acción de los agentes antimicrobianos

Los antimicrobianos usados en alimentos inhiben el metabolismo y por lo tanto, el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras. La acción de éstos puede ser inhibitoria o letal, dependiendo de las concentraciones en que se utilicen (Lück y Jager, 1997).

Aunque los mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos son distintos y no todos son conocidos, se sabe que la muerte de los microorganismos se basa en una serie de acontecimientos altamente selectivos. Junto a mecanismos físicos y fisicoquímicos, interfieren reacciones puramente bioquímicas. La actividad se debe principalmente a que “atacan” la pared celular, membrana celular, enzimas metabólicas, la síntesis de proteínas y el sistema

genético. Siendo que cada uno de estos puntos es esencial para el desarrollo celular, si uno es atacado o inactivado, la velocidad de crecimiento del microorganismo se ve minimizada (Davidson *et al.*, 2005).

4.3.2 Antimicrobianos naturales

La estabilidad de algunos alimentos contra el ataque por microorganismos se debe a la presencia de ciertas sustancias de manera natural, las cuales, se ha demostrado que tienen actividad antimicrobiana (Jay, 1996).

Se ha desarrollado un amplio rango de antimicrobianos naturales a partir de microorganismos, animales y plantas. Un gran número de ellos ya se emplean en la conservación de alimentos, mientras que muchos otros aún son estudiados para su uso como conservadores, como los extractos de plantas y frutos.

Matamoros (1998) menciona la existencia de una gran cantidad de plantas como recurso potencial de compuestos antimicrobianos; éstos incluyen numerosas sustancias de bajo peso molecular, como los compuestos fenólicos, que son los más predominantes. Particularmente, se han encontrado en diversas plantas, compuestos con actividad antifúngica, pertenecientes a grupos químicamente diversos como alcaloides, flavonoides, fenoles, cumarinas y terpenoides (Ben-Yehoshua *et al.*, 1995).

4.4 Aceites esenciales

Los aceites esenciales (también llamados aceites volátiles o etéreos) son mezclas complejas de sustancias, de olor aromático intenso, generalmente líquidos volátiles arrastrables por el vapor del agua, contenidos en los vegetales. Poseen una alta volatilidad a temperatura ambiente, la cual no se observa en otros agentes antimicrobianos; esta característica, junto con sus propiedades antivirales, antimicóticas, antioxidantes, antiparasitarias e insecticidas, han incrementado su interés por ellos (Ortuño, 2006; Pérez, 2006).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se debe a la presencia de sustancias bioactivas como flavonoides, terpenos, coumarinas y carotenos (Viuda-Martos *et al.*, 2008).

De los millones de plantas existentes en nuestro planeta, se conocen alrededor de 4000 aceites esenciales distintos. Las plantas aromáticas son las que concentran una mayor cantidad de esencias y por tanto, constituyen la materia prima para su obtención, bien sea empleando toda la planta, sólo sus hojas, flores, frutos o raíces, dependiendo de la planta concreta de que se trate (Ortuño, 2006).

En una misma especie, la composición tanto cuali como cuantitativa de la esencia puede variar según la parte considerada, las condiciones del medio en que se hayan desarrollado, la época del año, su dotación genética particular, etc. (Fisher y Phillips, 2008).

La principal ventaja de los aceites esenciales es que pueden utilizarse en cualquier alimento y la FDA las ha considerado como sustancias GRAS (Generally Regarded as Safe), siempre y cuando su efecto se logre con el mínimo cambio en las propiedades organolépticas del alimento (Viuda-Martos *et al.*, 2008; Burt, 2004).

4.4.1 Propiedades físicas y organolépticas de los aceites esenciales

Generalmente, los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente. Su volatilidad o capacidad de evaporación al contacto con el aire, a dicha temperatura, los diferencia de los aceites fijos. Dentro de los compuestos aromáticos, el peso molecular se restringe a máximo 250g/mol para que las sustancias puedan volatilizarse (Pauli, 2001).

Son fácilmente alterables o sensibles a la oxidación, aunque no se enrancian como los lípidos. Poseen tendencia a polimerizarse, dando lugar a la formación de productos resinosos, especialmente aquellos que contienen alcoholes terpénicos insaturados, variando su olor, color y viscosidad. Son aceites grasos, fácilmente solubles en solventes orgánicos, como éter de petróleo, cloroformo, benzol o alcohol absoluto; y casi insolubles en agua, a la que comunican su olor (Pérez, 2006).

La densidad de los aceites esenciales varía de 0.84 a 1.18 g/cm³; siendo, la gran mayoría, menos densa que el agua. Poseen un índice de refracción elevado, con un promedio de 1.5 y generalmente presentan actividad óptica (Pérez, 2006).

4.4.2 Composición de los aceites esenciales

Los componentes de los aceites esenciales son importantes, ya que la composición, tanto cualitativa como cuantitativa, determina las características de los mismos y su potencial antimicrobiano (Fisher y Phillips, 2008). Numerosas publicaciones han presentado información de la composición de varios aceites esenciales. Empleando cromatografía de gases y espectrometría de masas se obtienen análisis de composición detallados de ellos, encontrando que pueden poseer más de 60 componentes individuales. Sin embargo, los componentes mayoritarios llegan a constituir más del 85% del aceite esencial, mientras que los otros componentes están presentes sólo como trazas (Coronel, 2004).

Según Pérez (2006), dentro de los principales compuestos de los aceites esenciales, se encuentran los terpenos, los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano y otros compuestos diversos. Éstos últimos se encuentran en pequeñas cantidades y son ácidos orgánicos como el acético, valérico, isovalérico; cumarinas y cetonas de bajo peso molecular, etc.

Los aceites esenciales provenientes de frutos cítricos, contienen de 85 a 99% de componentes volátiles y de 1 a 15% de componentes no volátiles. Los primeros son una mezcla de monoterpenos como el limoneno, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados, incluyendo aldehídos como el citral, cetonas, ácidos, alcoholes como el linalool, y ésteres (Fisher y Phillips, 2008).

Se han encontrado 200 compuestos químicos diferentes, presentes en el aceite esencial de naranja, de los cuales se han identificado 100. Los monoterpenos abarcan hasta el 97% de la composición, con alcoholes, aldehídos y ésteres abarcando el menor porcentaje de componentes (1.8 a 2.2%). El principal componente de dichos aceites es el limoneno, cuya estructura se observa en la figura 2. Dicho compuesto puede llegar a abarcar hasta un 98% de la composición del aceite esencial de naranja (Fisher y Phillips, 2008).

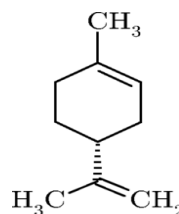


Figura 2. Estructura química del Limoneno (Merck Chemicals, 2009)

4.4.3 Extracción de aceites esenciales

Los aceites esenciales generalmente se aíslan de plantas que no poseen celulosa y lignina, a través de métodos como prensado, extracción, fermentación o destilación. En general los rendimientos de extracción varían desde 0.1 a 2%, existiendo algunas excepciones, como por ejemplo la badiana china con un rendimiento del 5% o el clavo de olor, con más de 15% de aceite esencial (Costa-Batlloori, 2003).

4.4.3.1 Extracción por destilación por arrastre con vapor

La destilación por arrastre con vapor es una técnica utilizada para separar sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles de otros productos no volátiles mezclados con ellas. Es la más comúnmente utilizada, tanto a nivel industrial como de laboratorio, para la producción de aceites esenciales, ya que estos poseen compuestos volátiles y arrastrables por el vapor de agua; además de que es una técnica sencilla y económica, que posee una gran versatilidad a la hora de aplicarlo a materiales vegetales diferentes (Jiménez *et al.*, 2006; Ortuño, 2006).

El fundamento detrás de esta técnica de extracción está dado por el rompimiento del tejido vegetal por efecto de la temperatura del vapor (100°C) liberando así el aceite esencial después de un cierto tiempo (Sánchez, 2006).

Las sustancias arrastrables por el vapor son inmiscibles en agua, tienen presión de vapor baja y su punto de ebullición es alto. Al destilar una mezcla de dos líquidos inmiscibles, su punto de ebullición será la temperatura a la cual la suma de las presiones de vapor de cada líquido es igual a la presión atmosférica (Jiménez *et al.*, 2006).

En esta técnica, la muestra se sitúa en un recipiente a través del cual se hace pasar vapor de agua generado en otro recipiente. Se hace pasar una corriente de vapor de agua por la muestra que contiene el compuesto a extraer, lo que ocasiona que se caliente la muestra y el vapor arrastre los componentes volátiles hacia un sistema de enfriamiento típico de una destilación simple. El destilado se recoge, separa y purifica (Pérez, 2006).

4.4.3.2 Otros métodos

Además de la destilación por arrastre con vapor, existen otros métodos para la obtención de aceites esenciales, como el prensado en frío, extracción con grasa en caliente y extracción con disolventes, ya sea derivados del petróleo, fluidos supercríticos o disolventes no derivados del petróleo (Ortuño, 2006).

La extracción con grasa en caliente (enfleurage) y el prensado en frío son métodos antiguos que ya no se emplean. Para el primero, se utilizan grasas naturales con puntos de ablandamiento de alrededor de 40°C, normalmente manteca de cerdo RBD (refinada, blanqueada, desodorizada), la cual se extiende en bandejas y sobre ella se coloca el material vegetal al cual se va a extraer el aceite. 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, la cual se lava con alcohol. Este se filtra y destila a vacío hasta recuperar mínimo un 80% del volumen de alcohol utilizado (Ortuño, 2006; Sánchez, 2006).

A pesar de la gran cantidad de aceite esencial que se obtiene en el caso del prensado en frío, este método es muy laborioso, requiere mucha mano de obra y está ampliamente superado técnicamente (Ortuño, 2006). El material vegetal es sometido a presión, bien sea en prensas tipo batch o en forma continua. Para los cítricos antiguamente se empleó el método manual de la esponja, que consiste en exprimir manualmente las cáscaras con una esponja hasta que se empapa de aceite y se exprime para liberar el aceite esencial (Sánchez, 2006).

La extracción con solventes consiste en un proceso muy suave que se utiliza cuando se sabe que el contenido en esencia es bajo, o cuando sus constituyentes son muy delicados. Los disolventes utilizados normalmente son: éter etílico, éter de petróleo, hexano y benceno; los cuales deben eliminarse posteriormente, a presión reducida, para obtener un residuo de consistencia semisólida que requiere ser purificado por un tratamiento con alcohol absoluto (Ortuño, 2006).

Este método de extracción se lleva a cabo a condiciones de temperatura y presión ambientales y requiere que las muestras sean previamente molidas, picadas o maceradas, a modo de incrementar el área de contacto entre ellas y el solvente a utilizar. Durante el proceso también son extraídos algunos otros componentes como gomas, ceras, grasas, colorantes, proteínas y carbohidratos, por lo que el material residual suele ser de consistencia semisólida (Sánchez, 2006).

La extracción con fluidos en condiciones supercríticas es el desarrollo más reciente. Se fundamenta en el punto en el que un gas o vapor ya no puede ser licuado por cambios de presión y/o temperatura y tiene la ventaja de no alterar la composición del aceite esencial ni dejar ningún resto de disolventes, pero como contrapartida, presenta los inconvenientes derivados del alto costo del equipo necesario, así como de un costo de operación también elevado, debido al empleo de altas presiones y equipos con cierres herméticos para trabajo con gases. Además, suele extraer compuestos ajenos al aroma como pigmentos o ceras, que se incorporan al aceite esencial. La sustancia más empleada suele ser el CO₂, puesto que representa baja viscosidad, baja tensión superficial y un alto coeficiente de difusión que

permite incrementar el contacto con la superficie del material, por lo que puede penetrar pequeños poros o rendijas, asegurando así una extracción más eficiente en un menor tiempo (Ortuño, 2006; Sánchez, 2006).

La extracción con disolventes no derivados del petróleo es una alternativa que casi no se utiliza. Pretende heredar las ventajas de la extracción con disolventes convencional, evitando en cambio el contacto del material vegetal con disolventes derivados del petróleo (Ortuño, 2006).

4.4.4 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

La actividad antimicrobiana de distintos aceites esenciales se ha evaluado en numerosas ocasiones, obteniendo resultados satisfactorios para gran cantidad de vegetales y microorganismos. Dicha actividad depende de diversos factores, entre los que destacan la estructura química de los componentes del aceite y su concentración (Guenther *et al.*, 1973). Algunos componentes con actividad antimicrobiana son los flavonoides, terpenos, coumarinas y carotenos, además de alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonas (Viuda-Martos *et al.*, 2008).

French (1985) señala que es extremadamente difícil correlacionar la actividad antimicrobiana a un único compuesto o clase de compuestos, ya que los diversos componentes de cualquier aceite pueden actuar sinérgicamente. Por ello, es necesario un enfoque integral

para explicar las capacidades antimicrobianas de un aceite esencial, cuyo desempeño podría ser el resultado de cierto balance cuantitativo de varios componentes, donde los efectos sinérgicos prevalecen (Caccioni *et al.*, 1998).

El mecanismo de acción de los aceites esenciales, como agentes antimicrobianos no ha sido estudiado con gran detalle. Considerando el gran número de compuestos químicos distintos presentes en los aceites esenciales, es más probable que sus actividades antimicrobianas no sean atribuibles a un mecanismo en específico.

Por un lado, dado que los aceites esenciales son altamente lipofílicos, son capaces de disolverse en las membranas biológicas, desarreglando estructuras y volviéndolas más permeables. Esto puede dar lugar a la salida de iones y otros contenidos celulares (Knobloch *et al.*, 1986).

Uribe *et al.* (1985) relacionan bajas concentraciones de aceites esenciales con cambios en la estructura celular, lo que podría inhibir la respiración y alterar la permeabilidad de la membrana celular del microorganismo, mientras que altas concentraciones provocarían daños severos a la membrana y la pérdida de homeostasis, dando lugar a la muerte celular. Conner y Beuchat (1984) sugieren que la actividad antimicrobiana se produce por la interacción de los aceites esenciales con los sistemas enzimáticos que tienen relación con la producción de energía y la síntesis de componentes estructurales de las células microbianas.

Por otro lado, se ha sugerido que los componentes de los aceites esenciales cruzan la membrana celular, interactuando con las enzimas y proteínas de la membrana y produciendo un flujo de protones hacia el exterior de la célula, lo que induce a cambios en esta, dando como resultado su muerte (Omidbeygi *et al.*, 2007).

Daferera *et al.*, (2000) reportaron que la actividad antifúngica de los aceites esenciales podría deberse a la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de los compuestos fenólicos del aceite y los sitios activos de ciertas enzimas; mientras que Lucini *et al.* (2006) indicaron que la inhibición del crecimiento micelar es causada por los monoterpenos presentes en los aceites esenciales. Estos componentes podrían incrementar la concentración de peróxidos lipídicos como radicales hidroxilo, alcoxilo y alkoperoxilo y dar como resultado la muerte de la célula.

Particularmente, se sabe que el ciclo de vida de las especies *Aspergillus* comienza con la germinación de la conidia (espora asexual) y se forma un tubo germinativo. Éste crece en una hifa vegetativa, la cual se elonga y ramifica en dos dimensiones en el medio. Posteriormente se desarrolla una hifa reproductiva (micelio aéreo) y un órgano de formación de conidias llamado fialide arriba de la hifa. La fialide produce un gran número de conidias hacia el exterior, las cuales se separan y comienzan a germinar. Inouye (2003) reportó que los vapores de los aceites esenciales atacan en las tres etapas de este ciclo: en la etapa de germinación, en la de crecimiento del micelio y en la etapa de esporulación.

Se piensa que la absorción del aceite esencial en el microorganismo es fundamental para la expresión de su actividad y que la absorción depende de la lipofilidad del aceite y del sitio del moho donde está actuando. Inouye (2003) afirma que la inactivación de la conidia del aire por medio de vapores de aceites esenciales es el proceso clave en la fumigación, ya que la conidia suspendida en el aire es estable al calor, luz y químicos, y por lo tanto es difícil de eliminar.

Por otro lado, el efecto antiesporulante se ha observado sólo por contacto con vapores pero no por contacto con soluciones; puesto que los vapores de los aceites esenciales pueden unirse directamente a la hifa reproductiva, mientras que en solución no pueden unirse a la hifa suspendida en el aire (Inouye, 2003).

Las técnicas comúnmente utilizadas para estudiar las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se centran en la dilución del aceite en agar, recurriendo a la obtención de valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) (Janssen *et al.*, 1986). La evaluación sistemática de la actividad de los vapores, según Inouye *et al.* (2001), fue reportada inicialmente en 1959, usando la técnica de la caja petri invertida. Esta técnica, en la cual el compuesto volátil ubicado en una copa o disco de papel, era expuesto al medio de agar invertido inoculado con las cepas en cuestión a alrededor de 5mm de distancia, resultaba conveniente y fue utilizada por investigadores subsecuentes. Sin embargo, bajo estas condiciones el espacio del aire era demasiado pequeño para medir la concentración del vapor del aceite esencial.

Nuevos estudios sobre la medición de la actividad de los vapores se han llevado a cabo, utilizando cajas con capacidades de un litro de aire o mayores. Se ha encontrado que la acción antimicrobiana de los aceites esenciales por contacto gaseoso es eficiente a concentraciones altas y durante tiempos cortos. Niveles de vapores entre 0.1 a 0.9 mg/L en aire podrían inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (Inouye *et al.*, 2001). Estudios sobre la efectividad de los vapores de aceites de tomillo y orégano han demostrado que son buenos agentes tanto bacteriostáticos, como bactericidas contra *E. coli*, *S. typhimurium* y *P. aureginosa* (Pérez, 2006); así como los vapores de aceites de canela, ajo, te-limón y naranja son capaces de controlar el crecimiento de mohos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* (Coronel, 2004).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de cítricos se ha evaluado previamente contra bacterias y mohos. O'Bryan *et al.* (2007) determinaron, mediante dilución en agar, la concentración mínima inhibitoria (MIC) de distintos aceites esenciales de naranja contra 11 cepas de *Salmonella*, obteniendo resultados satisfactorios y MICs entre 0.125% y 1%.

Por otro lado, Viuda-Martos *et al.* (2008) estudiaron, mediante dilución en agar, la acción antifúngica de los aceites esenciales de limón, mandarina, toronja y naranja en mohos comúnmente asociados con el deterioro de alimentos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium verrucosum*; llegando a la conclusión de que los cuatro aceites esenciales estudiados muestran capacidad de reducir o inhibir el crecimiento de los mohos mencionados.