

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Extracción del aceite

Se extrajo el aceite esencial a partir de cáscara de naranja fresca mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor, ya que esta técnica representa un bajo costo, además de ser fácil de usar y brindar rendimientos efectivos; por lo que es ampliamente usada a nivel tanto industrial como laboratorio. Al utilizar agua como solvente en dicha técnica, se obtiene una ventaja importante en la posible aplicación del aceite en contacto directo con alimentos, puesto que las propiedades del agua no perjudican al aceite.

La materia prima fue caracterizada, midiendo el índice de madurez y espesor de la cáscara de naranja empleada para la destilación. Para ello, se utilizó una fracción representativa de la fruta adquirida, obteniendo un porcentaje de madurez de 7.901 ± 3.816 y un grosor de cáscara de 2.344 ± 0.560 mm.

La extracción del aceite se llevó a cabo con un rendimiento aproximado del 0.5% (p/p), ya que para 500g de cáscara de naranja fresca, se obtuvieron alrededor de 3.1mL (2.66g) de aceite, tras un proceso de destilación de alrededor de tres horas, partiendo del montado del sistema y calentamiento del agua.

El rendimiento de extracción obtenido es aceptable, ya que se ha reportado que la mayoría de los aceites cuentan con rendimientos de extracción de 0.5 a 2% y, particularmente para naranja oscilan entre 0.5 y 0.8%, el cual depende de la variedad y madurez de la fruta, equipo y método de extracción, preparación de la muestra y solventes utilizados (Costa-Batllo, 2003).

7.2 Propiedades físicas del aceite

7.2.1 Densidad

La densidad del aceite esencial de cáscara de naranja, a 25°C es de $850 \pm 100 \text{ kg/m}^3$, la cual coincide con un valor reportado de 850 kg/m^3 (Viuda-Martos *et al.*, 2008) y se aproxima estrechamente con el rango reportado en la norma NMX-F-063-1978, de $842 - 846 \text{ kg/m}^3$

Como se puede observar, la densidad del aceite es menor a la del agua, característica que era de esperarse. Esta característica es la responsable de hacer posible la separación del aceite del agua al final del proceso de destilación.

7.2.2 Color

Las coordenadas de color L, a, b se presentan en la tabla I, así como sus equivalentes en X,Y,Z. De acuerdo con la escala de color Hunter, se puede deducir que el aceite es transparente con

cierta tonalidad naranja. Esta descripción corresponde con la apariencia descrita en la norma NMX-F-063-1978, de líquido cristalino cuyo color varía del amarillo claro al anaranjado oscuro.

Tabla I. Coordenadas de color del aceite esencial de cáscara de naranja

Coordenadas de color	
L	95.340±0.127
a	0.240±0.269
b	0.790±0.198
X	89.250±0.099
Y	90.870±0.198
Z	106.075±0.035

7.2.3 Índice de refracción

De acuerdo con lo reportado por Pérez (2006), los aceites esenciales poseen un índice de refracción elevado, con un promedio de 1.5. En el caso de Viuda-Martos *et al.* (2008) reportan un índice de refracción del aceite esencial de cáscara de naranja de 1.47 a 20°C, valor que corresponde con el obtenido en este trabajo a 25°C, de 1.470.

La medición de esta propiedad se utiliza como prueba fisicoquímica para el control de pureza y calidad de aceites puros.

7.3 Composición química del aceite (cromatografía de gases- espectrometría de masas)

En la figura 7 se muestra el espectro del aceite esencial de cáscara de naranja, en el cual se lograron identificar 7 compuestos principales. A fin de identificar los picos de menor tamaño detectados entre los minutos 10 y 15, se realizó una ampliación del espectro, la cual se presenta en el apéndice C.

El compuesto predominante en el aceite es el Limoneno, presente en un 96.62%, de acuerdo con el análisis cuantitativo realizado al aplicar el principio de que el área bajo la curva de los picos es directamente proporcional a su concentración.

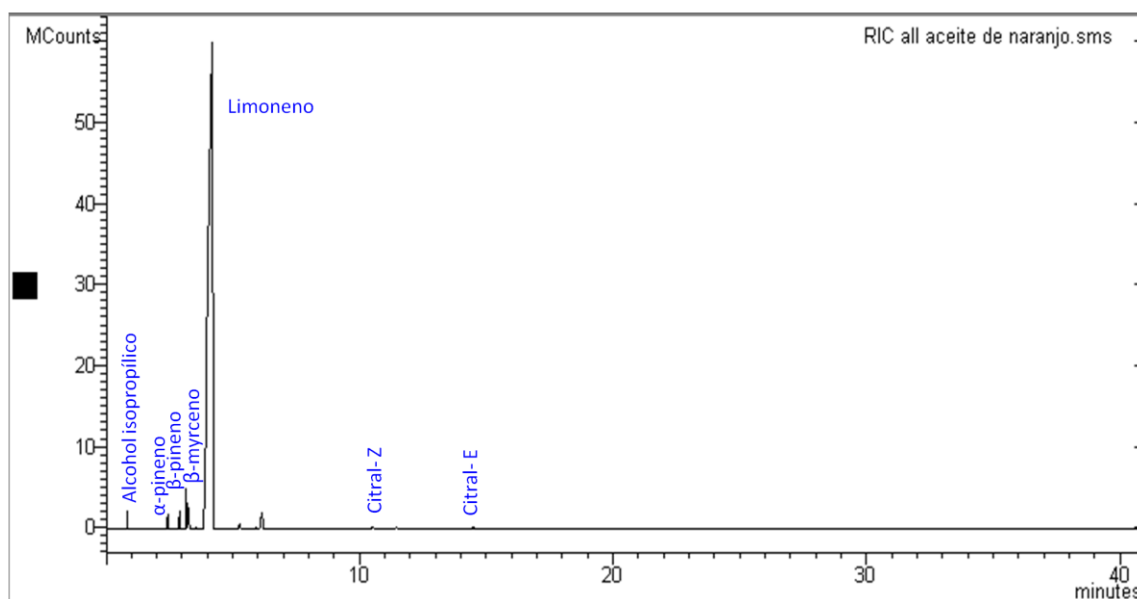


Figura 7. Espectrograma del aceite esencial de cáscara de naranja

Las otras 6 sustancias presentes se enlistan en la tabla II, acompañadas de su composición, así como la composición reportada en la bibliografía. De las 7 sustancias mencionadas, se ha reportado la presencia de 6 en el aceite esencial de cáscara de naranja (α -pineno, β -pineno, β -myrceno, Citral-Z y Citral-E) (Stashenko *et al.*, 1996; Maróstica y Pastore, 2007; David *et al.*, 2002). Es probable que tal diferencia se deba tanto a la variedad y madurez de la naranja a partir de la cual se extrajo el aceite, las condiciones del medio en que se desarrolló y la época del año, además del método de extracción del mismo (Fisher y Phillips, 2008).

Tabla II. Análisis cualitativo y cuantitativo de la composición química del aceite esencial de cáscara de naranja

Compuesto	Composición %	% Literatura	Clasificación
Limoneno	96.62	94.00% ^S	Monoterpeno
β-myrceno	1.72	1.18% ^S	Monoterpeno
β-pineno	0.53	-	Monoterpeno
α-pineno	0.47	0.54% ^S	Monoterpeno
Alcohol isopropílico	0.32	-	Alcohol
Citral-Z	0.15	0.09% ^S	Aldehído
Citral-E	0.18	0.14% ^S	Aldehído

S: Stashenko *et al.*, 1996.

La eficacia antifúngica de algunos aceites esenciales se ha relacionado con el contenido de monoterpenos, entre ellos el limoneno (Adinee *et al.*, 2008; Caccioni *et al.*, 1998); así como con la presencia de citral (Mahmoud, 1994; Caccioni *et al.*, 1998). Sin embargo, es sumamente

difícil correlacionar la actividad antimicrobiana con los componentes de manera individual. French (1985) señala que los diversos componentes que conforman el aceite deben actuar de manera sinérgica para inhibir el crecimiento de los microorganismos.

7.4 Efectos de la concentración y concentración mínima inhibitoria del aceite esencial para el crecimiento de *Aspergillus flavus*

7.4.1 Adición directa del aceite en el agar

Como ya se había reportado previamente, el aceite esencial de naranja, agregado directamente al agar en sistemas modelo, es eficaz contra el crecimiento de *A. flavus*, habiéndose inhibido completamente su crecimiento utilizando una concentración de 16,000 ppm.

En la figura 8 se puede apreciar la manera en que disminuyó el crecimiento del microorganismo con el incremento en la concentración de aceite en el agar, partiendo de 500ppm hasta llegar a 16,000ppm; concentración a la cual no se presentó crecimiento del microorganismo. De esto se deduce que la concentración mínima inhibitoria de aceite esencial de cáscara de naranja, aplicado por adición directa, para el crecimiento de *A. flavus*, se encuentra en un rango de 8,000 a 16,000 ppm. Viuda-Martos *et al.* (2008) reportaron una concentración de 0.94% (7,990ppm) de aceite esencial de naranja para inhibir el crecimiento de dicho microorganismo durante un periodo de 9 días. Dicho valor no se aleja demasiado del rango obtenido en este estudio y se ha reportado que las diferencias en el efecto

antimicrobiano en un mismo tipo de aceite pueden atribuirse a factores como la calidad de la fruta, las condiciones ecológicas en que se cultivó, así como su grado de madurez al momento de la extracción (Moreira *et al.*, 2005).

En la figura 8 se observa un comportamiento aparentemente contrario al crecimiento esperado entre el control y la concentración de 500ppm, además de ser muy similar; por lo que dichos datos se sometieron a la prueba de t-studentT (Apéndice D), utilizando el software Minitab, a partir de lo cual fue posible determinar que no existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.

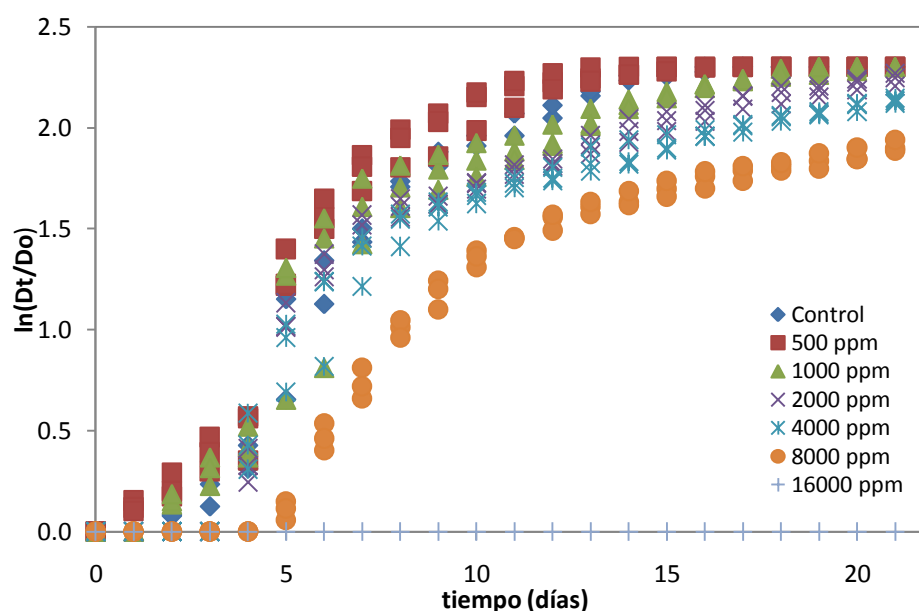


Figura 8. Crecimiento de *A. flavus* a distintas concentraciones de aceite diluido en agar

Los parámetros que caracterizan la cinética de crecimiento se obtuvieron ajustando los valores experimentales de crecimiento a una modificación de la ecuación de Gompertz (Char *et al.*, 2006). Los ajustes realizados (Apéndice E) se consideraron como buenos, a partir de los

coeficientes de correlación (R^2) obtenidos para cada una de las concentraciones, los cuales variaron dentro de un rango de 0.986 a 0.997.

La velocidad de crecimiento radial a cada una de las distintas concentraciones se puede apreciar en la figura 9, donde se observa una tendencia a disminuir la velocidad con el incremento de la concentración.

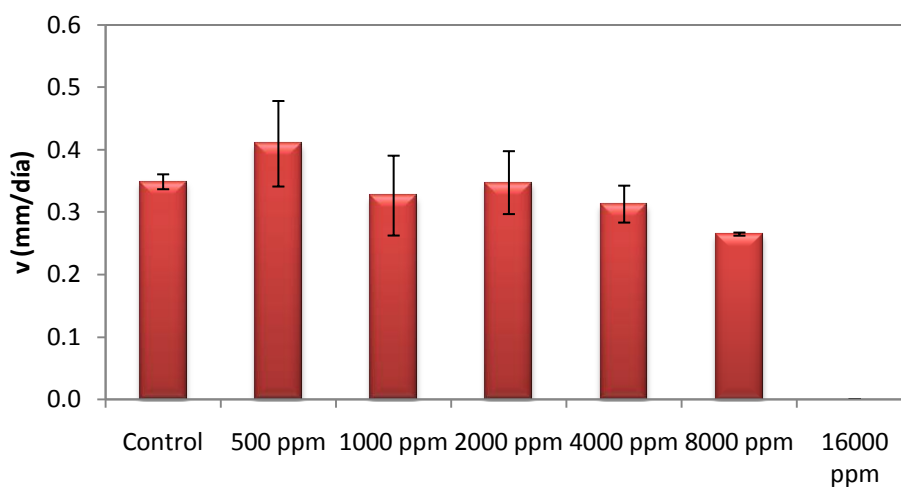


Figura 9. Velocidad de crecimiento radial de *A. flavus* a distintas concentraciones de aceite

En la figura 10 se encuentra graficado el tiempo lag (λ), el cual muestra una tendencia a incrementar su valor a mayores concentraciones de aceite esencial. Esto es una clara señal de que la adición del aceite provoca un retraso en el crecimiento del microorganismo, habiendo comenzado a crecer, hasta 4.4 días después de su inoculación para una concentración de 8,000 ppm.

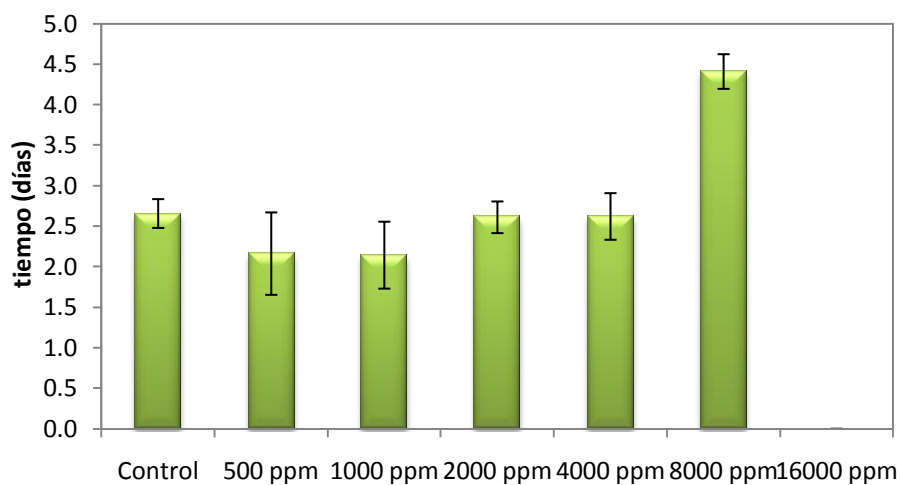


Figura 10. Tiempo lag (λ) de *A. flavus* para distintas concentraciones de aceite

El parámetro A o crecimiento máximo en la fase estacionaria, es un parámetro adimensional que permite observar qué tanto crecieron las colonias a las distintas concentraciones de aceite empleadas. Sus valores se encuentran graficados en la figura 11, los cuales disminuyen conforme incrementa la concentración desde 0 (control) hasta 16,000 ppm, donde el crecimiento del microorganismo fue nulo.

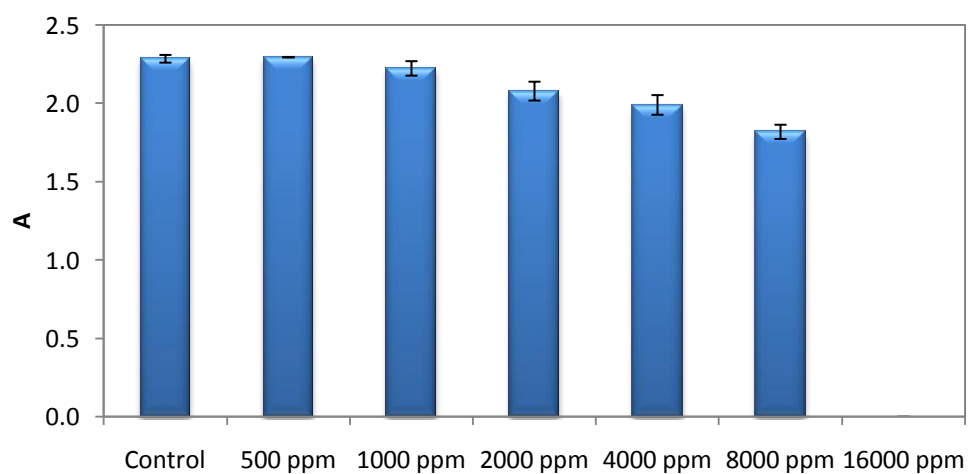


Figura 11. Crecimiento máximo en la fase estacionaria (A) de *A. flavus* para distintas concentraciones de aceite

7.4.2 Generación de vapores del aceite

El efecto antifúngico de los vapores de aceite esencial de cáscara de naranja se evaluó utilizando dosis de 0.6, 1.2, 2.4, 4.7 y 9.4 mL de aceite por litro de aire en cámaras cerradas herméticamente y la influencia que estas presentaron sobre el crecimiento de *A. flavus* se puede apreciar en la figura 12, donde es clara la inhibición del crecimiento de dicho microorganismo conforme se incrementa la cantidad de aceite, hasta llegar a una concentración de 9.4 mL de aceite por L de aire. A dicha concentración el crecimiento del microorganismo fue nulo.

Dado lo anterior, es posible establecer que la concentración mínima inhibitoria para el crecimiento de *A. flavus* mediante la técnica de generación de vapores, se encuentra entre 4.7 y 9.4 mL de aceite/L de aire.

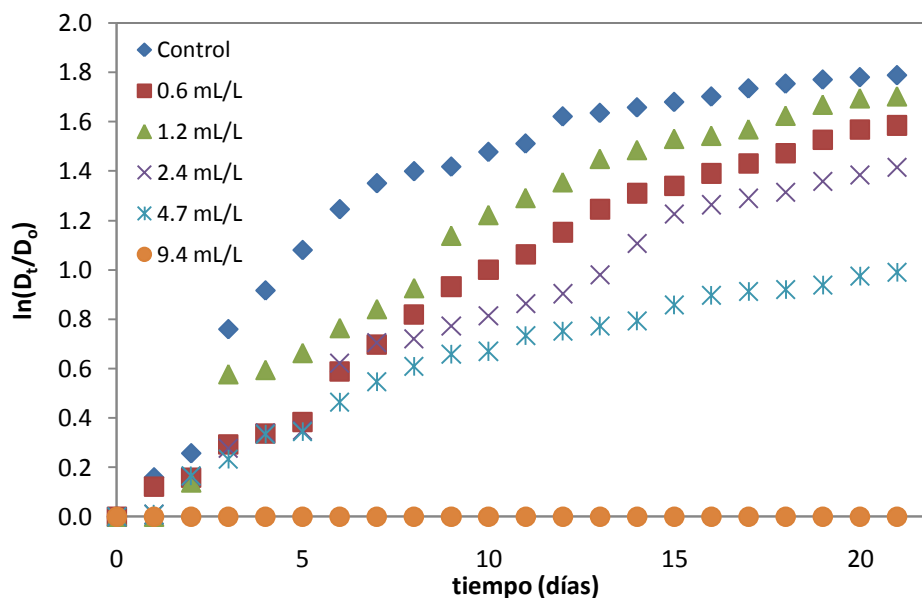


Figura 12. Crecimiento de *A. flavus* a distintas cantidades de aceite por L de aire

De manera similar que en la adición directa, el efecto que se observa en la figura 12 para las concentraciones de 1.2 y 2.3 mL/L se invierte en relación al crecimiento esperado; para lo cual, se llevó a cabo la prueba de t-student (Apéndice D), determinando que no existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.

La cantidad de aceite esencial de naranja requerida para inhibir el crecimiento de *A. flavus*, es mucho mayor que las cantidades que han sido reportadas en la literatura para otros microorganismos y utilizando distintos aceites esenciales con composiciones diversas. Inouye (2003) reporta que para inhibir el crecimiento de *A. fumigatus*, se requiere una dosis mínima inhibitoria de 0.4g de aceite esencial de yuzu (*Citrus junos*) por litro de aire, siendo el Limoneno (82.5%) el componente mayoritario de dicho aceite. En el caso del aceite esencial de Lavanda (*Lavandula angustifolia*), cuyos componentes mayoritarios son el Linalool (28.6%) y Linalyl acetato (30.2%), se requiere una dosis mínima de 0.04g/L de aceite para inhibir el crecimiento del mismo microorganismo.

Nuevamente, se obtuvieron los parámetros A , v y λ para caracterizar la cinética de crecimiento de *A. flavus* sometido a los vapores generados por el aceite esencial de cáscara de naranja, ajustando los datos experimentales del crecimiento de dicho microorganismo a la ecuación de Gompertz modificada. Los ajustes fueron aceptables, al encontrarse dentro de un rango de valores de 0.979 a 0.995 para el coeficiente de correlación (R^2).

En la figura 13 se encuentra graficada la velocidad de crecimiento radial a cada una de las concentraciones utilizadas en el trabajo, disminuyendo su valor con el incremento en la cantidad de aceite utilizado.

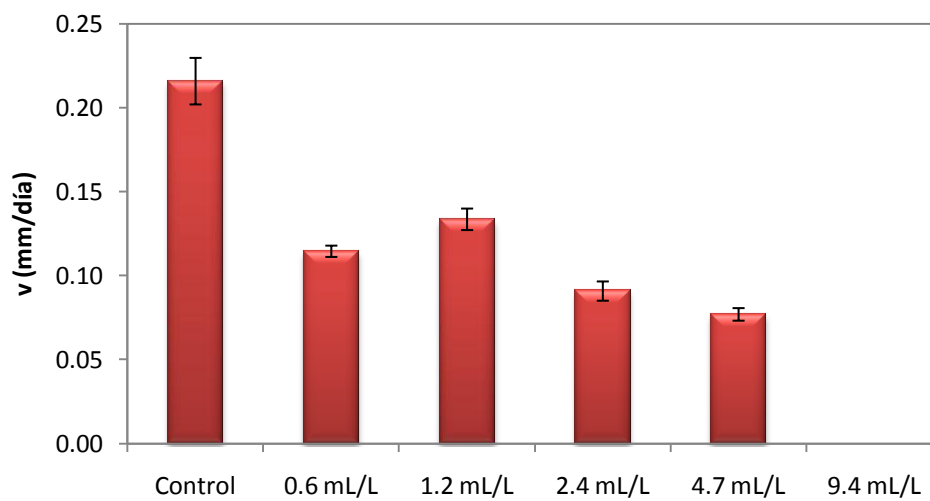


Figura 13. Velocidad de crecimiento radial de *A. flavus* a distintas cantidades de aceite por L de aire

El tiempo lag (λ) a distintas concentraciones de aceite esencial se presenta en la figura 14. En contraste con el efecto de la adición directa del aceite, la variación en el tiempo lag con la concentración de aceite no es significativa, habiéndose dado el crecimiento en un lapso de tiempo muy cercano a un día para todas las concentraciones utilizadas y por esta misma razón, se obtuvieron desviaciones estándar muy amplias.

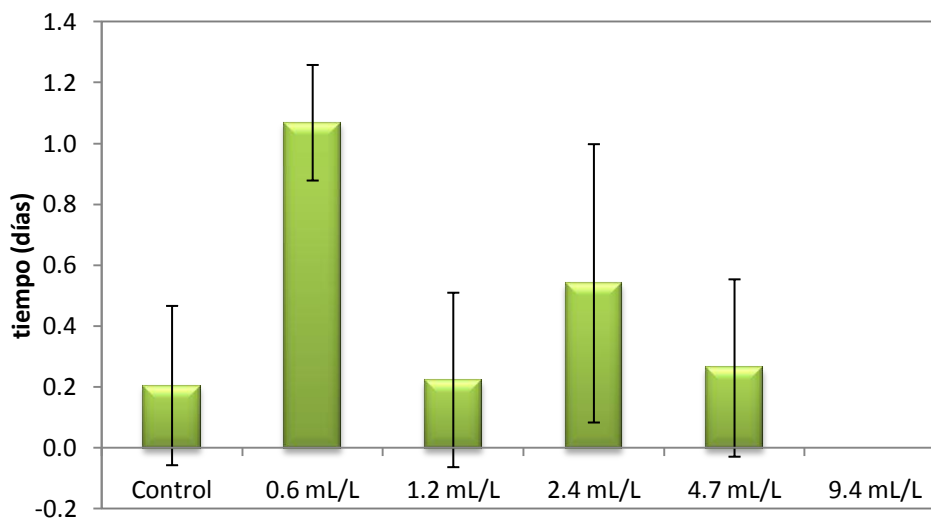


Figura 14. Tiempo lag (λ) de *A. flavus* para distintas cantidades de aceite por L de aire

A partir de la gráfica de la figura 15, se observa que al aumentar la concentración de aceite, el tamaño de las colonias de *A. flavus* es menor, lo cual se refleja en la disminución del valor de A, hasta 9.4mL/L de aire, donde no hubo crecimiento de la colonia.

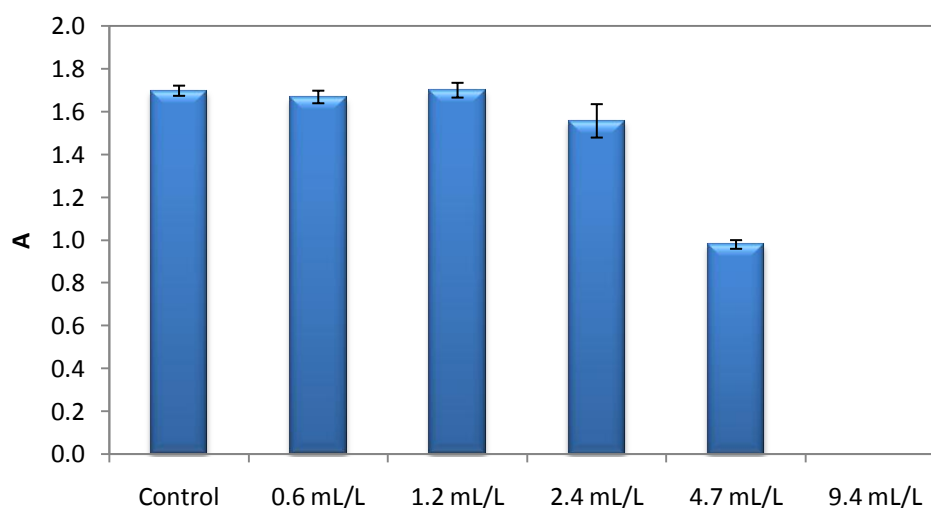


Figura 15. Crecimiento máximo en la fase estacionaria (A) de *A. flavus* para distintas cantidades de aceite por L de aire

7.4.3 Comparación de ambos métodos

En la tabla III se resumen los valores de los parámetros de la cinética de crecimiento de *A. flavus* a las diversas concentraciones de aceite a las cuales fue sometido, tanto en la metodología de dilución en agar, como en la generación de vapores. Igualmente, en dicha tabla se incluyen los coeficientes de correlación obtenidos para cada concentración, tras el ajuste de la ecuación de Gompertz a los datos experimentales, mientras que dicho ajuste se puede apreciar gráficamente en el Apéndice E.

Tabla III. Comparación de los parámetros de cinética de crecimiento de ambos métodos y coeficientes de correlación.

	v	λ	A	R²
500 ppm	0.409±0.069	2.162±0.509	2.296±0.002	0.994
0.6 mL/L	0.114±0.003	1.068±0.190	1.669±0.029	0.995
1000 ppm	0.326±0.064	2.143±0.413	2.225±0.046	0.986
1.2 mL/L	0.133±0.006	0.223±0.287	1.700±0.034	0.987
2000 ppm	0.347±0.050	2.611±0.195	2.080±0.060	0.987
2.4 mL/L	0.091±0.006	0.541±0.457	1.557±0.078	0.983
4000 ppm	0.312±0.030	2.621±0.288	1.992±0.063	0.989
4.7 mL/L	0.077±0.004	0.263±0.291	0.980±0.020	0.991
8000 ppm	0.264±0.002	4.410±0.214	1.820±0.045	0.997
9.4 mL/L	0.000	0.000	0.000	1.000
16000 ppm	0.000	0.000	0.000	1.000
18.8 mL/L	-	-	-	-

Las concentraciones empleadas para ambas metodologías pueden describirse como equivalentes, en la forma en que se encuentran agrupadas en la tabla III para su comparación.

Es por ello que se puede afirmar que la concentración mínima inhibitoria para la metodología de generación de vapores es menor que la concentración requerida por dilución en agar. De la misma manera, Inouye (2003) afirma que los valores de la concentración mínima inhibitoria por contacto gaseoso son menores en comparación con los requeridos por dilución.

En la figura 16 se aprecia de manera más clara la influencia que ambos métodos ejercen sobre la velocidad de crecimiento de *A. flavus*, la cual se ve claramente afectada por los vapores del aceite esencial, adoptando valores mucho más pequeños en comparación con las velocidades de crecimiento alcanzadas por las colonias que fueron sometidas a la dilución del aceite en el agar.

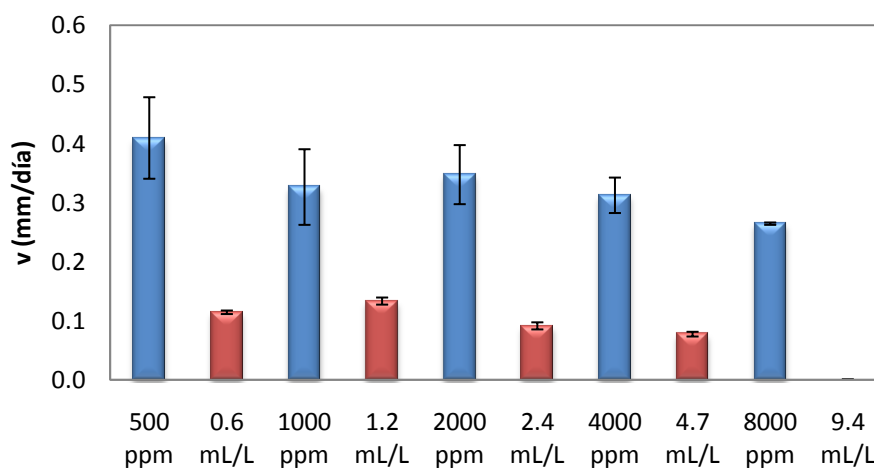


Figura 16. Comparación del efecto que tienen la adición directa y la generación de vapores del aceite esencial de naranja en la velocidad de crecimiento de *A. flavus*

Al contrario de la velocidad de crecimiento, el efecto que tiene el aceite esencial de naranja en el tiempo lag no es significativo a través de los vapores generados por dicho aceite,

mientras que la adición directa del mismo da lugar a un notorio retraso en el crecimiento del moho. Dicho efecto se aprecia gráficamente en la figura 17.

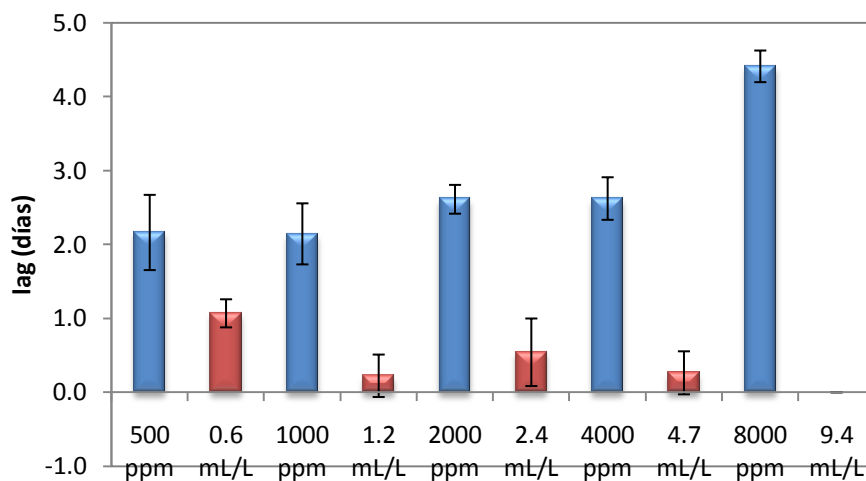


Figura 17. Comparación del efecto que tienen la adición directa y la generación de vapores del aceite esencial de cáscara de naranja en el tiempo lag (λ) para *A. flavus*

Al observar la figura 18 se percibe una vez más, una mayor inhibición del crecimiento de *A. flavus* mediante los vapores generados del aceite, en comparación con la dilución del mismo en el agar; ya que, aunque en ambos casos disminuye el crecimiento máximo alcanzado en la fase estacionaria (A), en los casos en que se aplicó la generación de vapores, el valor de A se reduce en mayor magnitud que en la adición directa.

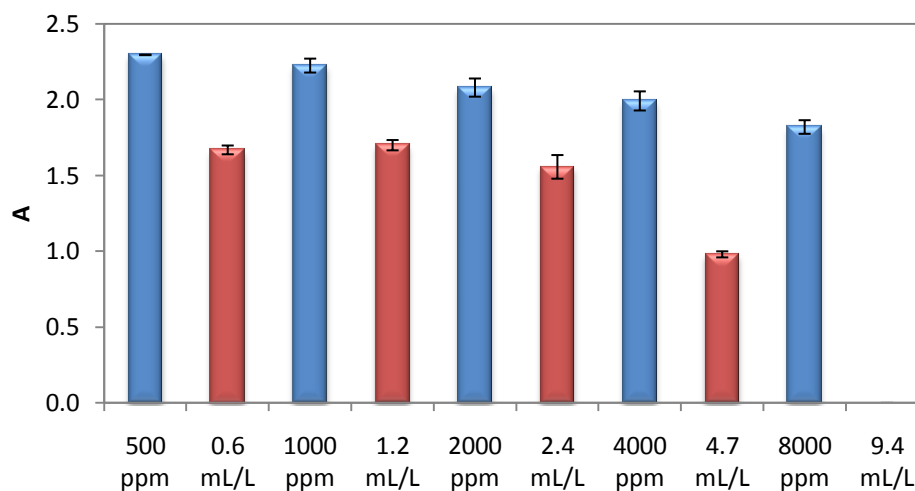


Figura 18. Comparación del efecto que tienen la adición directa y la generación de vapores del aceite esencial de cáscara de naranja en el crecimiento máximo de *A. flavus*

La alta bioactividad de los aceites esenciales en estado vapor, comparada con aquella en medio acuoso se ha reportado previamente. Fries (1973) indicó que las moléculas lipofílicas, en medio acuoso, tienden a asociarse entre ellas formando micelas, lo que reprime el acoplamiento y absorción de los componentes del aceite al organismo objetivo, lo cual es esencial para la expresión de su bioactividad (Inouye, 1998).

De acuerdo con Inouye (2003), es sumamente importante la acción directa de los vapores de aceites esenciales sobre las conidias, ya que estas, al flotar en el aire, son usualmente estables al calor, la luz y agentes químicos, además de ser difíciles de eliminar. El efecto antiesporulante se ha observado únicamente por contacto gaseoso, pero no mediante contacto en solución. Asimismo, los aceites esenciales en estado gaseoso pueden ligarse directamente a las hifas reproductivas, pero cuando estos se encuentran diluidos en el medio, no pueden adherirse a las hifas presentes en el aire.