



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES- CUAUTITLAN

"CARACTERIZACION Y COMPROBACION DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE CITRICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO

P R E S E N T A

IGNACIO RUBEN SANCHEZ IBARRA

DIRECTOR:

Q.F.B. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO

M.en C. RENE MIRANDA

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES- CUAUTITLAN

**"CARACTERIZACION Y COMPROBACION DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE CITRICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO

P R E S E N T A

IGNACIO RUBEN SANCHEZ IBARRA

DIRECTOR:

Q.F.B. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO

M.en C. RENE MIRANDA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Caracterización y comprobación de la actividad antimicrobiana del aceite de las semillas de cítricos"

que presenta el pasante: Ignacio Rubén Sánchez Ibarra
con número de cuenta: 9256252-5 para obtener el TITULO de:
Químico

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 28 de Marzo de 2020

PRESIDENTE	<u>C. Rafael García Barrera</u>	
VOCAL	<u>M.P.E. Susana Patricia Miranda Cuevas</u>	
SECRETARIO	<u>C. Victoria Hernández Palacios</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>L.R. del Saturnino Nava Ramírez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Gabriel Arroyo Razo</u>	

EI PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN UNAM, BAJO LA ASESORIA DE Q.F.B. PATRICIA MIRANDA CASTRO Y M. C. RENE MIRANDA.

A mis padres

Es muy difícil expresar el reconocimiento por la ayuda recibida durante toda mi formación por parte de mis padres, que con su valiosa dedicación hacia mi formación, me permitieron alcanzar mi meta. La cual es de ambos. Por lo cual no hay palabra ni formas de expresarles mi gratitud.

GRACIAS

Dedico este trabajo a la profesora Patricia Miranda que con su valioso apoyo, me permitió llevar a cabo este trabajo de tesis.

A todos mis profesores por brindarme sus conocimientos. Especialmente a los profesores Rafael García, Elia Catalina, Guillermo Penieros, ya que sin su confianza y apoyo no hubiera sido posible la realización de la presente

A mis compañeros y amigos, porque durante todo este lapso de tiempo me permitieron hacer más fáciles los momentos difíciles durante la carrera, y porque con su amistad me dieron fuerzas para seguir adelante cuando me equivoqué. (Chaquiras, Benito, Memo, Jason y todos los 219)

INDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
OBJETIVOS	5
ANTECEDENTES.....	6
Generalidades de cítricos.....	6
Producción de cítricos	7
Composición química	9
Generalidades de grasas y aceites.....	11
Actividad antimicrobiana.....	12
METODOLOGIA.....	15
Extracción de aceites.....	17
Transesterificación de aceites.....	17
Análisis de aceites	17
Actividad antimicrobiana	18
Mínima concentración inhibición	19
RESULTADOS	20
Análisis de aceites	20
Actividad antimicrobiana	21
Mínima concentración inhibición	25
CONCLUSIONES	27
GLOSARIO	28
BIBLIOGRAFIA	29
CROMATOGRAMAS	32

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de los principales componentes de los cítricos	9
Tabla 2. Estructura y origen de los ácidos grasos	11
Tabla 3. Disolventes de los ácidos grasos	18
Tabla 4. Cepas ATCC utilizadas	20
Tabla 5. Densidades de los ácidos grasos	21
Tabla 6. Resultados del análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	22
Tabla 7. Prueba de actividad antimicrobiana de los solventes	23
Tabla 8. Prueba de actividad antimicrobiana de los aceites	23
Tabla 9. Promedio de inhibición del extracto de limón.	25
Tabla 10 Promedio de inhibición del extracto de toronja	25
Tabla 11 Resultados de la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto de limón	26
Tabla 11 Resultados de la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto de toronja	26

RESUMEN

Se ha demostrado la actividad antimicrobiana de aceites extraídos de las semillas de cítricos. En el presente trabajo se realizó la extracción de los aceites de semillas de toronja, mandarina, limón y naranja, así como su análisis químico y su posterior comprobación de actividad antimicrobiana. Su extracción fue por disolventes, el análisis químico se realizó de acuerdo al reporte de espectrometría de masas y correlación de sus características fisicoquímicas; así mismo, se ensayaron microbiológicamente (por medio de la técnica de sensidiscos o Kirby- Bauer) sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas de colección ATCC sugeridas, para probar actividad antimicrobiana.

En este estudio se encontró que los ácidos grasos contenidos en los diferentes aceites tienen actividad antimicrobiana y actúan sobre patógenos gram positivos como para gram negativos. Se comprobó que solo los aceites de las semillas de toronja y limón tuvieron actividad antimicrobiana.

De los aceites obtenidos se encontraron los siguientes ácidos grasos linoléico, oléico, esteárico y palmítico.

INTRODUCCIÓN

Una de las mayores contribuciones de la ciencia al desarrollo de la humanidad, ha sido el aislamiento de una serie de productos procedentes de plantas, animales y microorganismos para su aplicación y desarrollo para preservar y conservar la salud o simplemente como un control sobre ciertos microorganismos perjudiciales.

Es difícil comprender para cualquiera que haya nacido en el mundo industrializado durante los últimos cuarenta años, la acción devastadora de algunas enfermedades (tifoidea cólera), las cuales han perdido parte de la terrible aureola que poseían a principios del siglo y en algunos casos han dejado de ser una sentencia de muerte. Ahora constituyen los nombres de determinadas enfermedades que responden a un tratamiento adecuado.

Pocas son las sustancias extraídas o sintetizadas que han podido doblegar o terminar con microorganismos patógenos. Para que un proceso de este tipo se lleve a cabo, es necesario ensayar si los compuestos extraídos de vegetales, pueden llegar a tener actividad en contra de tales microorganismos y así posteriormente determinar tanto la dosis mínima que no sea tóxica al ser humano, como las reacciones colaterales.

Uno de los problemas de algunos agentes antimicrobianos, es el abuso de los mismos, que puede generar microorganismos resistentes a estos agentes por lo que el estudio de nuevas sustancias con actividad antimicrobiana resulta necesario.

La demostración de la actividad antimicrobiana sobre algunas cepas patógenas con aceites extraídos de semillas de cítricos así como su análisis se presentan a continuación.

OBJETIVOS

Objetivo general

Extraer y analizar los aceites de cuatro cítricos comunes y posteriormente evaluar su actividad antimicrobiana.

Objetivos particulares

I Analizar por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas los ácidos grasos presentes en los aceites de semillas de limón, toronja, mandarina y naranja.

II Determinar la actividad antimicrobiana de los aceites de semillas de limón, toronja, mandarina y naranja.

III Establecer la concentración mínima inhibitoria de los aceites de las semillas de limón, toronja, mandarina y naranja.

Hipótesis

La presencia de ciertos ácidos grasos en los aceites procedentes de las semillas de cítricos podrían presentar actividad antimicrobiana contra algunas bacterias.

ANTECEDENTES

Generalidades de los cítricos

Taxonomía

Los cítricos pertenecen a la familia Rutáceae encuadrada, junto con otras 11 familias dentro de la división Espermatofitas (embriofitas Sinfonógamas), subdivididas en Angiosperma, clase dicotiledónea, subclase Archiclamídeas, orden Geraniales, suborden 1, Geraninas. De entre las Rutáceas los agrios pertenecen a la subfamilia Aurantioideae que contiene de acuerdo con el sistema Swingle, 2 tribus, 6 subtribus, y 33 géneros, siendo la tribu de las Citreae, y dentro de ella la subtribu Citrina, la que contiene a los tres géneros más importantes de los cítricos: *Fortunelle*, *Poncirus* y *Citrus* (Agustín 1985).

El género *Citrus* es el que comprende un mayor número de especies, en él se encuentran la totalidad de especies cultivadas de interés económico. Ello, junto con la frecuencia de mutaciones espontáneas que sus especies presentan y la facilidad de cruzamiento entre éstas dificulta su estudio, bajo el punto de vista taxonómico, a pesar de lo cual la enorme labor desarrollada por los botánicos como Engler, Swingle y Tanaka, ha permitido sin mucha discrepancia establecer la clasificación entre los híbridos pertenecientes a este género.

Los árboles del género *Citrus* son regulares, forma globosa y ramas regulares; los brotes son flexibles, con nudos que van de 5 a 7 cm. de longitud y sus hojas son lanceoladas y medianas (Agustín 1985).

Los frutos de las principales especies y variedades cultivadas de agrios difieren por su color, su forma, grosor, la composición de su zumo y la época de maduración. El fruto es globoso, oval, o ligeramente ovoide, de piel delgada, superficie fina y cerosa y de color anaranjado (mandarinas y naranjas) o amarillo (limones y toronjas).

La cáscara constituye la parte no comestible del fruto. En las naranjas, mandarinas y limones, está poco desarrollada, mientras que en las toronjas constituye gran parte del fruto (Castellanos.1978).

La pulpa constituye la parte comestible del fruto y está constituida por un conjunto de sacos o vesículas que contienen el zumo y que están agrupados. El número de éstos varía de 5 a 18, siendo su distribución la siguiente.

- de 9 a 11 para las naranjas
- de 5 a 11 para los limones
- de 12 a 15 para las toronjas

El número de semillas es variable en función de la especie y de la variedad, igualmente las condiciones de polinización. Por ejemplo, las naranjas comunes en las que la fecundación es elevada o normal, los frutos presentan siempre un número elevado de semillas (10 a 20 por fruto). Por otra parte las naranjas que no contienen semillas o contienen muy poca, la fecundación de la flor o no existe o se llevó a cabo parcialmente.

Naranja; (*Citrus sinensis*)

Naranja Valencia. El origen de esta variedad es confuso, probablemente se originó en las islas Azores, a fines del siglo pasado, desde donde fue llevada a Florida por los Ingleses y posteriormente a Sudamérica.

El árbol es vigoroso, presenta un buen desarrollo y se adapta a diversos suelos y climas. Los frutos son medianos o grandes, esféricos y ligeramente alargados, de color intenso o algo pálido y de cáscara espesa y fina, muy pocas semillas pero elevado contenido de zumo.

Su producción se da principalmente en México y Sudamérica.

Mandarina; (*Citrus unshiu*)

Fruto de mediano a grande, con alto contenido de zumo, de color anaranjado intenso, de forma aplanada y, en ocasiones con la zona pendicular ligeramente aplanada con bastantes semillas y puede recolectarse a principios de octubre.

Toronja; (*Máxima burm*)

Árbol vigoroso, grande, se adapta bien al clima teniendo un intervalo abierto a condiciones climatológicas, pero los frutos de calidad se obtienen en climas calurosos. Fruto grande o muy grande, globo esferoidal, con o sin semillas, gruesas, grandes y su sabor es ligeramente amargo (Agustín 1985).

Limón; (*Citrus aurantifolia*)

El árbol es vigoroso, presenta un buen desarrollo y se adapta a diversos suelos y climas. Los frutos son medianos, esféricos y ligeramente ovalados, de color verde o algo pálido y con sabor agrio.

El limón, cítrico perteneciente a la familia de las Rutáceas, es originario del continente asiático, era desconocido por griegos y romanos pero fué cultivado por los Árabes de Persia e introducido al norte de Africa y sur de Europa entre los siglos 1000 y 1200 DC. A su vez, los cruzados lo introducen en toda Europa, de ahí que después de la conquista se introduzca a toda América. De ese modo llegó a México y en la actualidad su cultivo tiene gran importancia. En México se producen dos variedades importantes de limón, el persa y el agrio. Las cuales se producen en gran cantidad.

En 1985, México ocupó el tercer lugar como productor mundial, después de Estados Unidos e Italia seguido de la India. Durante 1982-1985 estos países aportaron el 59 % de la producción mundial, correspondiéndole a México el 11.7 % (Agustín 1985).

Producción nacional de cítricos.

De acuerdo a la Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural en su Centro de Estadísticas, en el Anuario Estadístico de la producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos 1996, la producción nacional de los *Cítricos* ocupa un lugar muy importante.

Debido a la situación geográfica del país, le permite producir innumerables variedades de productos en el campo. Los *Cítricos* pueden llegar a ocupar los primeros lugares de producción nacional y ocupar lugares muy importantes a nivel internacional. Una

muestra es la producción de naranja y limón que ocuparon el quinto lugar de producción en el ámbito mundial en 1995 y el segundo lugar en Latinoamérica.

La importancia de la producción de *Cítricos* se ve reflejada en la inversión en este ámbito ya que en 1996 solo de Toronja se sembraron 11,197 hectáreas, dando una producción de 245,810 toneladas, siendo los estados de Veracruz, Tamaulipas y Nuevo León los principales productores. La naranja se sembró en 279,971 hectáreas produciendo 3,101,028 toneladas, donde Veracruz, Tamaulipas, Nuevo León, Yucatán y Tabasco produjeron el 85 % del total. De la mandarina se produjeron 186,783 toneladas en 13,364 hectáreas sembradas en los estados de Veracruz, Nuevo León y San Luis Potosí. Se produce Limón en Colima, Michoacán, Veracruz un total de 916,831 toneladas de limón agrio y 172, 409 toneladas de limón persa (SAGDR 1995).

Composición química del jugo de limón y naranja.

Los cítricos están compuestos en su mayoría por agua, iones, carbohidratos (tabla N°1.) que son las características de esta fruta, aparte de contribuir con vitaminas necesarias en el metabolismo del humano. Un análisis revela la existencia de algunos metales comunes y lo anterior se muestra en la siguiente tabla.

Tabla NO. 1 Análisis de los principales componentes del fruto.

	Toronja %	Naranja %	Mandarina %	Limón %
Agua	85	88	87	81
Proteínas	3.6	0.8	3.6	5.6
Grasas	0.2	4.0	3.6	0.4
Carbohidratos	4.7	4.6	1.8	7.7
Vitamina A	0.00006 Unidades	0.120 Unidades	0.00008 Unidades	0.00006 Unidades
Vitamina C	0.100	0.050	0.080	0.152
Nicotinamida	0.0010	0.0002	-----	0.0002
Vitamina B ₁	0.00020	0.06	0.00012	0.00011
Vitamina B ₂	0.00014	0.02	0.00009	0.00011
Ac. Cítrico	0.85	1.0	1.3	1.5
Carotenos	---	0.0019	---	---
Pectinas	---	1.0	0.07	0.07
Celulosa	---	---	2.6	2.7
Vitamina P ¹	---	---	---	6 Unidades

¹ Los Cítricos: Uso y manejo Diccionario enciclopédico Quillet tomos V, VI. 1984.

Generalidades sobre grasas y aceites

Grasas y Aceites

Las grasas y los aceites constituyen una clase bien definida de sustancias neutras, solubles en éter etílico y otros disolventes orgánicos, pero no en agua. Producidas en alguna cantidad por todas las plantas y todos los animales. Las grasas y los aceites constan de triglicéridos o ésteres del glicerol y ácidos alifáticos de molécula elevada o de cadena larga, saturados y no saturados, llamados ácidos grasos. Las ceras se diferencian de las grasas en que son ésteres de ciertos alcoholes monovalentes superiores en lugar del glicerol.

Debido a que los ácidos grasos constituyen la mayor parte de los aceites y grasas (95%) las propiedades de éstos repercuten sobre las características de los aceites y las grasas.

No existe gran diferencia entre los aceites, que son líquidos, y las grasas que son sólidos o semisólidos (mantecas o sebos) a las temperaturas atmosféricas ordinarias debido a que las propiedades de estos compuestos son semejantes. Los aceites grasos se llaman también aceites fijos, para distinguirlos de los aceites esenciales (Adams 1985).

Los aceites esenciales, como los de la menta piperita, rosa, limón, naranja y pino entre otros, pueden definirse como aceites vegetales volátiles, así mismo se clasifican como lípidos debido a sus propiedades y su composición química semejante a las grasas, ceras y ácidos grasos. Se han estudiado las estructuras químicas de unos 500 aceites de los cuales su clasificación, puede dividirse en cuatro grupos importantes (Adams, 1985).

1. - Terpenos relacionados con el isopreno.
2. - Compuestos de carbono de cadena lineal, que no contienen cadenas laterales
3. - Derivados del benceno
- 4.- Aceites que no corresponden a las categorías anteriores

Los aceites esenciales de cítricos, la menta, yerbabuena, salvia, espliego, vara de oro, mejorana, rosas, jazmín, anís etc. se emplean en perfumes, cosméticos, goma de mascar, como condimentos en jabones o en productos de medicina (por su actividad antimicrobiana, antifúngica etc.). (Laguna, 1980).

Ácidos grasos

Los ácidos grasos están clasificados en saturados e insaturados, unos tienen cadenas ramificadas que contienen grupos hidroxilos, otros contienen una estructura cíclica al final de la cadena. Todos tienen una propiedad en común, además del grupo terminal carboxílico, contienen un número par de átomos de carbono solo si se han derivado de una grasa natural. Los ácidos grasos con número impar de carbonos son raros en la naturaleza, probablemente por el modo de realizarse la síntesis de los ácidos grasos a partir de fragmentos de dos carbonos (Laguna, 1980)

Ácidos grasos saturados e insaturados

Tabla No. 2 Estructura y origen de los ácidos grasos

Ácido graso	Formula	No de carbonos	Origen
SATURADOS			
Butírico/ butanoico	$\text{CH}_3(\text{CH})_2\text{COOH}$	4	Mantequilla
Capríico/ hexanoico	$\text{CH}_3(\text{CH})_4\text{COOH}$	6	Aceite de coco, de palma
Mirístico /tetradecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH})_{12}\text{COOH}$	14	Mantequilla lanolina
Palmitico/ hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH})_{14}\text{COOH}$	16	Grasas animales y vegetales
Estearico octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH})_{16}\text{COOH}$	18	Grasas animales y vegetales
INSATURADOS			
Oléico /9hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH})_{16}\text{COOH}$	18	Aceite de sardinas
Linoléico/ 9octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH})_{16}\text{COOH}$	18	Aceite de olivo
Linoléico 9,11,15-octadecatrienoico	$\text{CH}_3(\text{CH})_{16}\text{COOH}$	18	Aceite de tung

Lípidos: Edwin Mertz. 1992. "Bioquímica"

Los ácidos grasos que están saturados y contienen de 4 a 8 átomos de carbono, son líquidos a temperatura ambiente (tabla N°2). Los ácidos grasos saturados que contienen más de 8 átomos de carbono son sólidos, y su punto de fusión aumenta con la creciente longitud de la cadena.

La introducción de un doble enlace carbono-carbono en una molécula de ácido graso hace descender su punto de fusión tan notablemente que, incluso, ácidos grasos con más de 18 átomos de carbono se vuelven líquidos a temperatura ambiente (Laguna, 1980).

Los ácidos grasos insaturados, libres o combinados reaccionan con hidrógeno, oxígeno y halógenos, estos elementos se adicionan a los dobles enlaces.

Los ácidos grasos individuales purificados se preparan industrialmente en grandes cantidades en muchos países, partiendo de grasas y aceites animales y vegetales. Se obtienen primero a partir de ácidos grasos libres por saponificación o por intercambio de alcohol metílico, y los ácidos grasos individuales purificados se separan por destilación fraccionada con vacío. En este estado, los ácidos grasos tienen una infinidad de aplicaciones como lubricantes, detergentes, desinfectantes etc (Laguna, 1980).

Actividad antimicrobiana de los ácidos grasos.

Los ácidos grasos se concentran naturalmente en las semillas, durante algunos pasos del metabolismo, incluso el metabolismo secundario es proveedor de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas. El uso de los ácidos grasos para inhibir bacterias Gram positivas y Gram negativas resulta común en ciertos laboratorios (Nieman, 1945). Algunas de estas propiedades antimicrobianas son las que se mencionan a continuación:

- Los ácidos grasos presentes en algunas variedades de frutas especialmente en los cítricos presentan actividad antimicrobiana contra bacterias termofílicas. (Graham, 1953).

- Thomson (1967) demostró que los ácidos grasos de cítricos al 3 % de concentración tenían efectividad en reducir la viabilidad de la *Salmonella*.

- La *Escherichia coli* fue utilizada en numerosos estudios de inhibición por ácidos grasos, resultando un incremento de la inhibición, conforme crece el

número de carbonos de los ácidos grasos empleados (de 6 átomos de carbono a 11 átomos de carbono). El efecto de incremento de la inhibición se dió en donde se emplearon ácidos grasos de 8 a 11 átomos de carbono. (Eisler & Von Metz 1968).

- La actividad fungicida de algunos ácidos grasos esterificados tiene importancia relevante dentro de las investigaciones de actividad, incluso contra *Aspergillus niger* (Shibasaki.1975)

- La acción antimicrobiana de ciertos ácidos grasos esterificados de cadena larga (más de 16 átomos de carbono) insaturados han demostrado tener actividad contra *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum*, *Cándida utilis* (Dugas). (Bullerman, 1986).

- La acción inhibitoria del ácido cáprico sobre *Escherichia coli*, es en la envoltura interna o membrana celular, afectando el metabolismo celular, la sensibilidad de la membrana se ve afectada por la presencia del ácido cáprico formando una capa, lo que ocasiona la descompensación de proteínas presentes en la membrana (José P. Fay & Ricardo N. 1977).

Los efectos de inhibición de los ácidos grasos saturados e insaturados sobre la *Bordetella pertussis* depende de la concentración presente, por lo que a altas concentraciones saturan a la membrana interna causándole una inhibición total Leanne H. Parker 1979.

- La presencia de los ácidos palmítico, oléico, esteárico y linoléico en concentraciones de 200 nmol/ml activan la autólisis del *Streptococcus faecalis*, estas concentraciones de ácidos grasos saturan las células por lo que provoca una lisis bacteriana (Daniel. D. and Lolita -Morore. 1980).

- La presencia de ácidos como palmítico, esteárico, oléico y linoléico presentes en concentraciones 200 nmol/ ml inhiben en un 80 % la actividad de algunas

bacterias, inhibiendo el metabolismo energético por la saturación de ácidos grasos. (Carson. DD. 1980).

Finalmente es conveniente mencionar que la acción antimicrobiana presentada por los ácidos grasos de las semillas de limón y toronja no solo inhibe el metabolismo primario de las bacterias sino que también interfiere a nivel de la membrana, como se comprueba

con el ácido decanoico que provoca autólisis a nivel de membrana datos reportados por Fay J P (1977) demuestran que la acción inhibitoria del ácido decanoico es a nivel de la actividad metabólica inicial por lo que el daño es irreversible. La presencia de ácidos oléico y linoléico inducen la lisis en ciertas situaciones, tales efectos se ven reflejados en la inhibición de síntesis de componentes de la membrana.

Bacterias Patógenas.

Es relativamente pequeño el número de especies bacterianas que son reconocidas, sin contar con el papel que desempeñan al infectar a plantas animales y al propio hombre. Es por tal razón que las bacterias patógenas han sido estudiadas de manera especial.

Los *estafilococos*. Estos microorganismos son habitantes comunes de la piel, la nariz y la garganta del hombre, en donde residen habitualmente sin causar daño alguno. Sin embargo, *Staphylococcus aureus* puede infectar las heridas, producir accesos menores, tales como granos y forúnculos y en menor frecuencia, infecciones serias como bacteremia, osteomielitis (una inflamación en el hueso con descarga de pus) y neumonía.

En años recientes las cepas *estafilococos* que son resistentes a la penicilina y otros antibióticos, han causado numerosas infecciones serias en muchos hospitales.

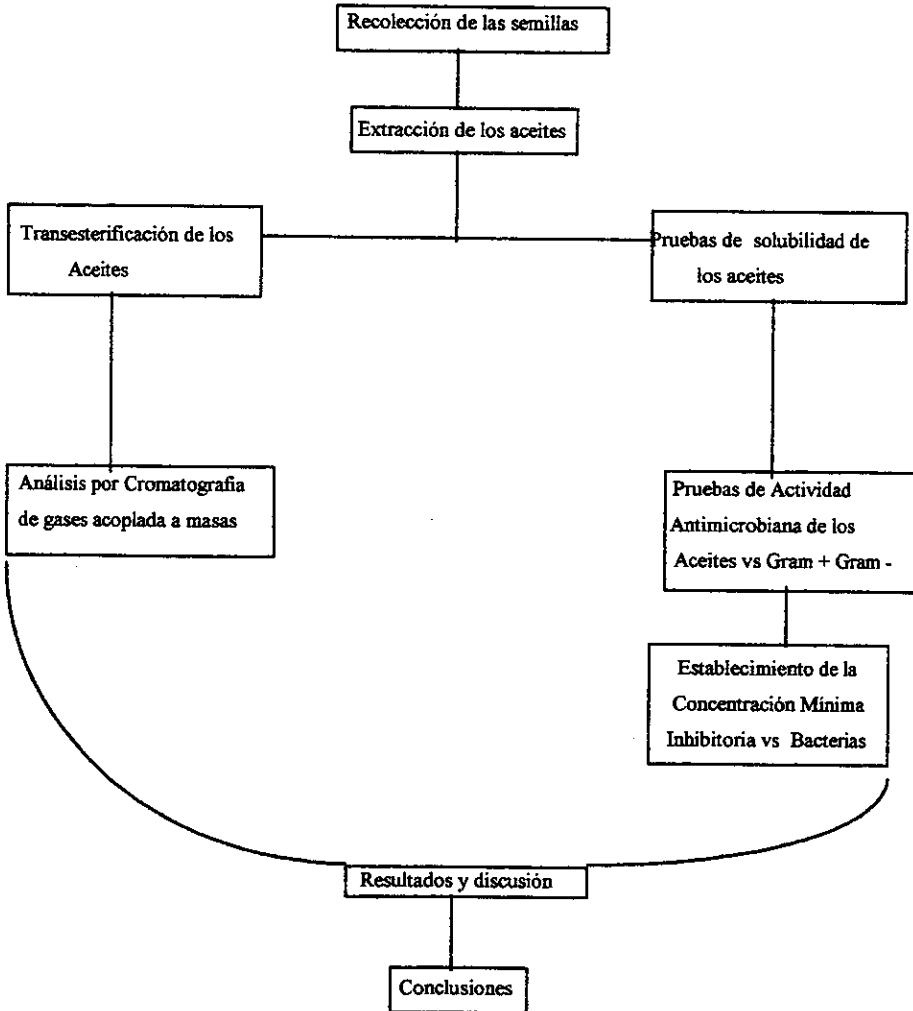
Los *micrococcus* son habitantes normales del cuerpo humano. Bajo condiciones normales esta especie es inocua. Sin embargo, pueden causar infecciones, siendo la más seria la endocarditis bacteriana, en la cual, el microorganismo crece en el interior de las paredes y válvulas del corazón.

Las *Pseudomonas* son saprófitas inocuas que viven en el suelo, el agua y en los tractos digestivos de los mamíferos. Son bacilos gram negativos con un solo flagelo terminal,

y generalmente producen uno o más pigmentos amarillos solubles en el agua. Las *Pseudomonas aeruginosa* es común en las heces y a menudo infecta el tracto urinario causando infecciones de vejiga y el riñón que son resistentes a la quimioterapia (Nishina 1991).

Metodología

Análisis químico y prueba de la actividad antimicrobiana de los aceites extraídos de semillas de limón, toronja, mandarina y naranja



Metodología

Este trabajo consta de la extracción del aceite de semillas de cítricos (limón, naranja, toronja y mandarina), su análisis por cromatografía de gases acoplada a masas y su posterior comprobación de la actividad antimicrobiana de los mismos.

La semillas se recolectaron de las siguientes variedades: limón *Citrus aurantifolia*, mandarina *Citrus unsgui marc*, toronja *Citrus maxima* y naranja *Citrus maxima*.

Cabe destacar que a las semillas se les realizó su clasificación taxonómica en laboratorios de la sección de agronomía y en el herbario de la FES- Cuautitlán campo 4.

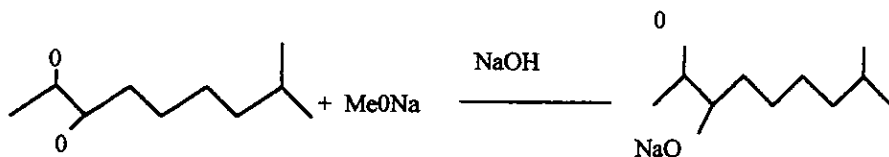
Una vez obtenidas las semillas fueron sometidas a secado a temperatura ambiente y la molienda se realizó utilizando un molino de tornillo.

Extracción de los aceites de las semillas

Los aceites se obtuvieron a través de una extracción hexánica utilizando un aparato soxtlet, la extracción tuvo una duración de 6 horas a reflujo; el exceso de disolvente se eliminó en un equipo de rotavapor a vacío, procurando no descomponer o volatilizar los compuestos orgánicos. El volumen del disolvente restante se eliminó a temperatura ambiente, teniendo como indicador la densidad constante, utilizándose un pignómetro.

Transesterificación de los aceites.

2g de aceite se mezclaron con 10 ml de disolución de metilato de sodio 2N (MeONa/MeOH), la mezcla obtenida se sometió a reflujo en metanol durante un periodo de cuatro horas. Concluido el tiempo de reacción la mezcla del crudo de reacción se filtró al vacío empleando una cama de celite y carbón activado. Por último, el filtrado se concentró a presión reducida. Esta reacción fue realizada para poder facilitar el análisis de los aceites.



Análisis de los aceites extraídos.

El análisis de los aceites se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, utilizando un cromatógrafo HP5890 serie 2 acoplado a espectro de masas JMS-AX505Ha con una columna de metilfenilsilicona al 5 % iniciando a una temperatura de 70 °C elevando la temperatura en intervalos de 10 °C con tiempos de dos minutos en cada intervalo, hasta alcanzar 270 °C con flujos de 100 ml/min y presión de 13 psi. Una vez obtenidos los cromatogramas, se realizó una búsqueda en la base de datos para identificar los ácidos grasos contenidos en los aceites.

Disolución de los aceites en diferentes solventes.

La prueba de disolución de los aceites en diferentes disolventes (tabla 3), fue realizada con solventes que facilitarían la difusión del aceite para la prueba de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram+ y Gram-. Se probó la disolución de los aceites en diferentes disolventes de acuerdo con su polaridad.

Tabla No. 3. disolventes.

Disolvente
Agua
Acetona
Acetato de etilo
Cloroformo
Alcohol
Glicerol
Alcohol- Glicerol (1:1)

La prueba de disolución se realizó mediante la mezcla de una parte del aceite por cinco partes del disolvente (1:5).

Prueba de actividad antimicrobiana de los aceites contra bacterias Gram+ y Gram-

Las pruebas de actividad antimicrobiana fueron llevadas a cabo utilizando la técnica de Kirby-Bauer, mejor conocida como técnica de difusión en disco. Esta técnica tiene como principio la interacción de una sustancia depositada en disco de papel con el inóculo del microorganismo sobre una base de agar. (Isenberg. 1992)

Para conocer la actividad antimicrobiana de los aceites se utilizó una técnica modificada, en lugar de utilizar discos de papel filtro se hicieron pequeños pozos sobre el agar en donde fue depositada la muestra del aceite.

Se prepararon cajas petri con agar Mueller-Hinton con un espesor de 3-5 mm. Se preparó un inóculo con cada una de las cepas bacterianas a probar bajo las condiciones marcadas en la técnica, las cuales son: que la turbidez del inóculo corresponda al 0.5 de concentración del estándar de Mc-Farland (1.5×10^8) y que cada uno de los inóculos sea depositado con ayuda de un hisópo esterilizado sobre la superficie del agar (Isenberg. 1992).

Posteriormente la muestra de la disolución del aceite fue depositada en los pozos hechos sobre el agar. Se depositaron muestras de 5, 10 y 15 μ l, usando como disolvente la mezcla de alcohol- glicerol- aceite (1:1:1) y colocando una muestra de disolvente sin el aceite como testigo.

Finalmente las cepas fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Una vez concluida la incubación, los halos de inhibición fueron medidos con escalímetro por la parte posterior de la caja de petri, con un ángulo de 45°C.

Para cada uno de los aceites fue probada su actividad contra bacterias de colección ATCC Gram+ y Gram- (tabla 4)

Tabla No. 4 Cepas a probar con los extractos

Cepa		No ATCC
<i>Bacillus cereus</i>	G (+)	11778
<i>Micrococcus luteus</i>	G (+)	9341
<i>Staphylococcus aureus</i>	G (+)	25925
<i>Staphylococcus aureus</i>	G (+)	6538P
<i>Escherichia coli</i>	G (-)	10536
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	G (-)	9027
<i>Escherichia coli</i>	G (-)	25922

Establecimiento de la concentración mínima inhibitoria.

Los aceites que presentaron inhibición de las bacterias fueron probados, variando la concentración a diferentes disoluciones decimales (1:10, 1:100, 1:100) del aceite usando como diluyente la mezcla alcohol- glicerol. Al encontrar la dilución decimal mínima inhibitoria, se procedió a trabajar con las diluciones dobles (1:2, 1:4, 1:8, 1:16).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de los aceites de las semillas

A los aceites obtenidos se les determinó la densidad (tabla 5). No existen datos reportados de estos sobre densidad. Los resultados se observan en la tabla No 5.

Tabla No 5. Densidades obtenidas

Extracto	Densidad
Limón	0.9582
Toronja	0.9152
Naranja	0.9418
Mandarina	0.9348

Los datos encontrados son densidades de ácidos grasos aislados o extraídos de alguna otra sección del cítrico. Por lo cual, los datos experimentales sobre la densidad de los aceites se pueden utilizar como referencia en alguna otra investigación que involucre la presencia de éstos. El rendimiento obtenido de la extracción de las semillas es el 40 % (P/V) aproximadamente para los cuatro casos.

Análisis de los aceites por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

El análisis de ácidos grasos fue realizado por cromatografía de gases acoplado a espectro de masas y dió como resultado la presencia de 5 ácidos grasos (tabla N°6) para los extractos de naranja, mandarina y 4 para los extractos de limón y toronja. El análisis químico por estas técnicas da una resolución amplia y exacta de cada ácido graso que se extrajo de las semillas de los cítricos.

Tabla No. 6 Por ciento de abundancia de los ácidos grasos reportados en el análisis.

Aceite	Ac. Cáprico	Ac. Estéarico	Ac. Oléico	Ac. linoléico	Ac. Palmítico
Naranja	8.41	59.63	3.80	22.79	5.38
Toronja	0.0	46.07	29.46	21.87	2.60
Limón	0.0	47.94	26.31	22.22	3.52
Mandarina	10.06	41.67	7.50	32.24	8.54

Esta abundancia se obtuvo de los análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los espectros así como su abundancia se encuentran en el anexo 1.

Con referencia a esto se buscó en los espectros de cada ácido como primera referencia, dando tres ácidos saturados cáprico, palmítico, esteárico y dos ácidos insaturados linoléico y oléico. Estos ácidos concuerdan con los espectros, en peso molecular y fórmula reportados en la bibliografía, confirmando lo reportado por Kiitr, 1992, donde se presenta el análisis de aceites de semillas (Toronja y Naranja). Los espectros del análisis y los reportados por Kiitr, 1992. así como su identificación se encuentran en el anexo 1.

En las pruebas de solubilidad de los aceites una vez probada su disolución, se comprobó que el disolvente no tuviera actividad contra las cepas bacterianas o afectara el medio de cultivo, dando como resultado que con la mezcla etanol-glicerol se obtuvo una difusión del aceite en el agar aceptable.

Resultados de la actividad antimicrobiana de los disolventes

De acuerdo con la difusión de los aceites y la nula actividad presentada por el alcohol y el glicerol (tabla 7), se realizó una mezcla alcohol + glicerol + aceite con la cual se obtuvo una mejor difusión, adecuada para la prueba de actividad antimicrobiana de los aceites.

Tabla No7. Prueba de actividad de los solventes.

Disolvente	Disolución	Inhibición
Agua	Nula	Negativa
Acetona	Completa	Positiva
Acetato de etilo	Completa	Positiva
Cloroformo	Media	Positiva
Alcohol	Media	Positiva
Glicerol	Media	Negativa
Alcohol- Glicerol	Completa	Negativa

Aceites que presentaron actividad antimicrobiana contra bacterias gram+ y gram-

La predominancia del ácido graso oléico dentro de los extractos de limón y toronja, en el balance porcentual de este ácido puede ser un factor que incida directamente en la actividad antimicrobiana presentada por los dos aceites (tabla 8). Los aceites de naranja y mandarina también presentan este ácido graso pero la cantidad es mínima dentro de estos extractos.

Tabla No. 8 Aceites con actividad antimicrobiana.

Aceite	CEPA	Actividad
Limón y toronja	<i>Bacillus cereus</i> G (+) 11778	Positiva
Limón y toronja	<i>Micrococcus luteus</i> G (+) 9341	Positiva
Limón y toronja	<i>Staphylococcus aureus</i> G (+) 6538P	Positiva
Limón y toronja	<i>Staphylococcus aureus</i> G (+) 25925	Positiva
Limón y toronja	<i>Escherichia coli</i> G (-) 10536	Positiva
Limón y toronja	<i>Pseudomona aeruginosa</i> G (-) 9027	Positiva
Limón y toronja	<i>Escherichia coli</i> G (-) 25922	Positiva

Existe otro factor que puede ser el causante de la actividad antimicrobiana, este puede ser la conformación de la estructura de las moléculas de ácidos grasos, la isomería que en muchos compuestos es determinante para dar la actividad antimicrobiana.

En el caso de los compuestos aromáticos, no es lo mismo la posición *orto*, *meta* o *para*; por ejemplo, las sales del ácido hidroxibenzoico, tienen una potente acción antiartrítica la cual no poseen los otros isómeros. Este simple acomodo estructural, permite a la molécula formar un enlace de hidrógeno intramolecular, con la que adquiere su actividad (Litter, 1970).

Otro caso de isomería, son los estereoisómeros que también tienen una gran importancia en la actividad de compuestos orgánicos, un ejemplo es *l-adrenalina* la cual posee una potencia farmacológica 20 veces mayor que la *d-adrenalina*. La isomería geométrica es un factor determinante (Litter en 1970).

En los diastereoisómeros o isomería *cis-trans*, debido a su distinta configuración en el espacio, existen diferencias farmacológicas; por ejemplo, la actividad estrogénica del isómero *cis*-dietilestibestrol es mucho mayor que la de su isómero *trans*-dietilestibestrol que no posee actividad. El análisis presentado por Kiiir 1985 revela la isomería *cis* para el ácido graso linoléico, dando una referencia de isomería, que pudiera ser el factor para que existiera actividad en dos de los aceites (toronja y limón).

La presencia de los ácidos palmítico, oléico, esteárico y linoléico en concentraciones de 200 nmol/ml activan la autólisis de algunas bacterias de acuerdo a Lolita -Morore en 1980, y de acuerdo a los resultados de este trabajo, estos cuatro ácidos grasos se encuentran presentes en los aceites de las semillas de limón y toronja.

Como se puede observar, la capacidad de inhibición es más fuerte en el extracto de limón, que en el extracto de toronja en la tabla 9 y 10

Tabla No 9. Promedio de diámetros de inhibición (mm) de los extractos de limón

Cepa			Promedio
<i>Bacillus cereus</i>	G (+)	11778	12.0 ± 0.0057
<i>Micrococcus luteus</i>	G (+)	9341	15.25 ± 0.5000
<i>Staphylococcus aureus</i>	G (+)	6538P	16.33 ± 0.5773
<i>Staphylococcus aureus</i>	G (+)	25925	7.75 ± 0.5000
<i>Escherichia coli</i>	G (-)	10536	13.00 ± 0.7071
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	G (-)	9027	16.33 ± 0.5775
<i>Escherichia coli</i>	G (-)	25922	17,3 ± 0.5152

Tabla No 10. Promedio de diámetros de inhibición (mm)de los extractos de toronja

CEPA			PROMEDIO cm
<i>Bacillus cereus</i>	G (+)	11778	5.2 ± 0.0732
<i>Micrococcus luteus</i>	G (+)	9341	11.33 ± 0.5775
<i>Staphylococcus aureus</i>	G (+)	6538P	9.66 ± 0.1547
<i>Staphylococcus aureus</i>	G (+)	25925	6.35 ± 0.5100
<i>Escherichia coli</i>	G (-)	10536	13.0 ± 0.0120
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	G (-)	9027	13.66 ± 0.1547
<i>Escherichia coli</i>	G (-)	25922	6.0 ± 0.5110

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LOS ACEITES DE SEMILLAS DE LIMÓN Y TORONJA

Se reportan los resultados obtenidos de la concentración mínima inhibitoria MIC del aceite de limón para las diferentes bacterias probadas.

Tabla No. 11 Concentraciones mínimas inhibitorias del aceite de Limón

CEPA	No TAC	MIC mg/ml
<i>Bacillus cereus</i>	11778	0.4791
<i>Micrococcus luteus</i>	9341	0.4791
<i>Staphylococcus aureus</i>	25925	0.4791
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538P	0.4791
<i>Escherichia coli</i>	10536	0.239
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	9027	0.4791
<i>Escherichia coli</i>	25922	0.239

Tabla No 12. Los resultados obtenidos de la concentración mínima inhibitoria MIC del aceite de Toronja

Cepa	No ATCC	MIC mg/ml
<i>Bacillus cereus</i>	11778	0.4575
<i>Micrococcus luteus</i>	9341	0.4575
<i>Staphylococcus aureus</i>	25925	0.4575
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538P	0.4575
<i>Escherichia coli</i>	10536	0.4575
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	9027	0.4575
<i>Escherichia coli</i>	25922	0.4575

CONCLUSIONES

Los aceites extraídos de las semillas de limón y toronja presentan actividad antimicrobiana, la cual no presentan los aceites extraídos de naranja y mandarina. La existencia en mayor cantidad del ácido graso oléico dentro de los extractos de limón y toronja, puede ser un factor que incida directamente en la actividad antimicrobiana presentada por los dos aceites de limón y toronja.

La actividad inhibitoria del aceite se incrementa con el aumento en el número de dobles enlaces presentes en la cadena de los ácidos grasos presentes por ejemplo los ácidos grasos como Oléico de 18 carbonos.

La existencia de la isomería cis dentro de los compuestos orgánicos pudiera marcar la diferencia entre un compuesto con actividad antimicrobiana y uno que no presenta actividad, por lo que se sugiere hacer un estudio estructural de isomería, en particular para los ácidos grasos de limón y toronja.

Las concentraciones mínimas inhibitorias son del orden de 0.4575mg/ml, en promedio para los dos extractos, para el caso del limón puede llegar su concentración mínima inhibitoria a 0.239mg/ml.

La actividad antimicrobiana presentada por los aceites es de amplio espectro, debido a que tal actividad actúa sobre bacterias gram positivas *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, así como a gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

GLOSARIO

Patógenos: Microorganismo o sustancia, que en mínimas concentraciones es perjudicial para el organismo.

Actividad antimicrobiana: Sustancia químicas sintetizadas, creadas por bacterias o naturales que inhiben el crecimiento, proliferación y desarrollo de microorganismos.

Rutáceas: Planta monocotiledónea de flores blancas y amarillas con frutos dehiscentes.

Monocotiledóneas : Grupo taxonómico que presenta un solo recubrimiento de la semilla.

Halo de inhibición: Límite provisto por la acción antimicrobiana de una sustancia hacia una microorganismo patógeno.

Inóculo: Técnica por la cual se agrega o se contamina un medio con un microorganismo para su crecimiento.

Bacterias Termofilicas: Bacteria que es capaz de soportar altas temperaturas sin tener alguna alteración o sufrir una lisis.

Viable: Proceso por el cual se comprueba, que un microorganismo puede llegar al fin de su desarrollo.

Concentración mínima Inhibitoria (MIC): Es la concentración necesaria para la inhibición de un microorganismo.

Zumo: Parte de los cítricos en la que presenta la mayor cantidad de carbohidratos.

Actividad fungicida: Sustancia química que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento, proliferación y desarrollo de hongos

Medio de cultivo: Caldo gelatinizado que contiene todos los nutrientes necesarios para un crecimiento adecuado para un microorganismo.

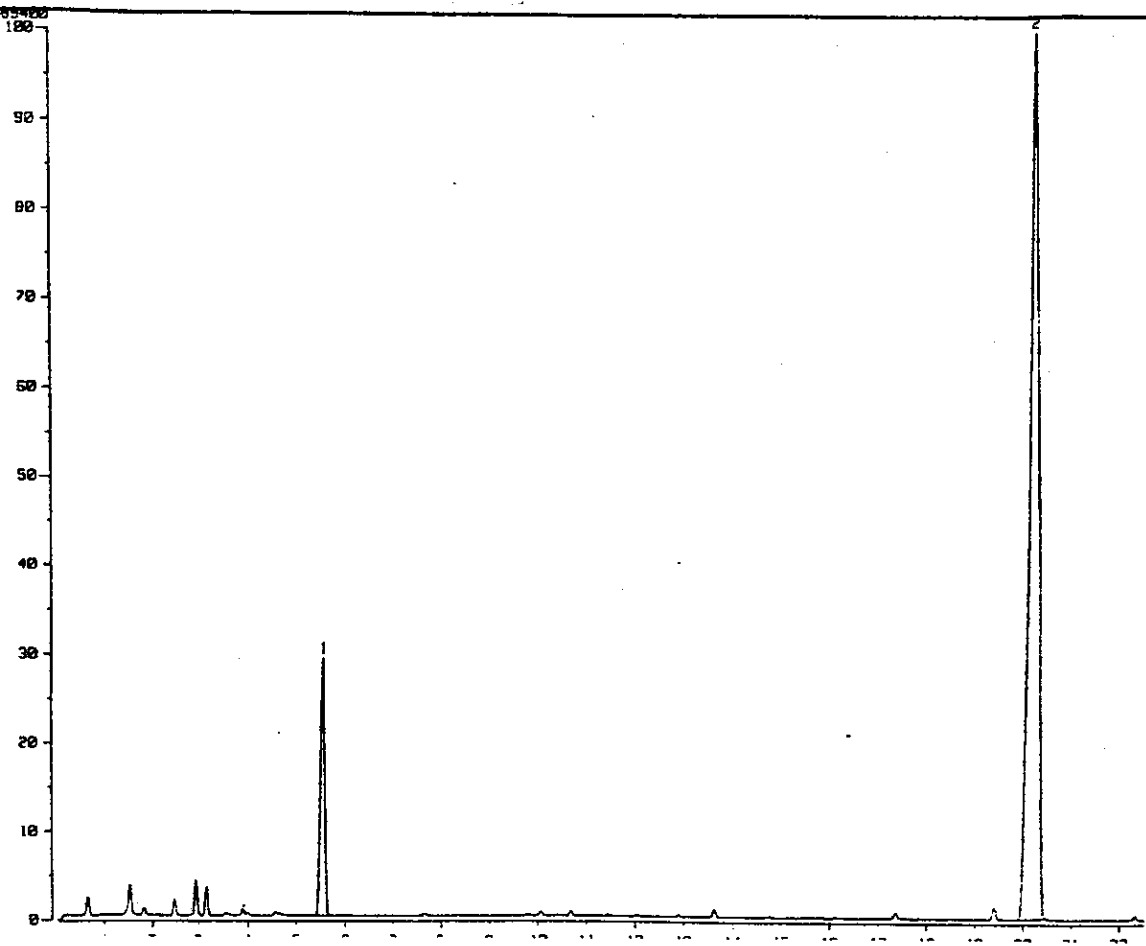
BIBLIOGRAFÍA

- ☞ Agustin, V. Aimela, "Aplicación de fitoreguladores en citricultura". Primera edición, Editorial Ledos. Barcelona 1985.
- ☞ Alan, S. Wingrove, "Química Orgánica," Tercera Edición, Editorial Harla. México. D. F. 1990.
- ☞ Angeles, E., "Antibióticos y su Acción," Editorial. Limusa, México, D.F. (1983).
- ☞ Bauer, M. Kirby, Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disk Method. American Journal of Clinical Pathology. 36, 493, (1966).
- ☞ Carson, D. D. Daneo, Moore, Effects of fatty acids on lysis of *Streptococcus faecalis*. Journal. Bacteriol, 22, 56, (1980).
- ☞ Conner, D. E, Beuchat, L. R, Effects of Essential Oils from Plants on Growth of Food. Journal of Food Science. 49, 985, (1984).
- ☞ Chipault, J. R., Misuno, G R., and Lundberg, W, "The Antioxidant Properties of Spices in Foods," Food Technology, 10, 209- 211 (1956).
- ☞ Douglas, L. Marshall, Lloyd, B, Antimicrobial Activity of Sucrose Fatty Acid Ester Emulsifiers. Journal of Food Science. 51, 468, (1986).
- ☞ Dugan, L, "Stability Fats and Rancidity," Journal American. Oil Chemistry Soc., 32, 605-609 (1955).
- ☞ Farias, R. N, Trucco, R, Aislamiento y caracterización de mutantes de *Escherichia coli*. que desarrollan en ácidos grasos de cadena corta. Revista Latinoamericana de Microbiología 14, 11-13, (1972).
- ☞ Fay J. P, The inhibitory action of fatty acids on the growth of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 12, 423, (1975).

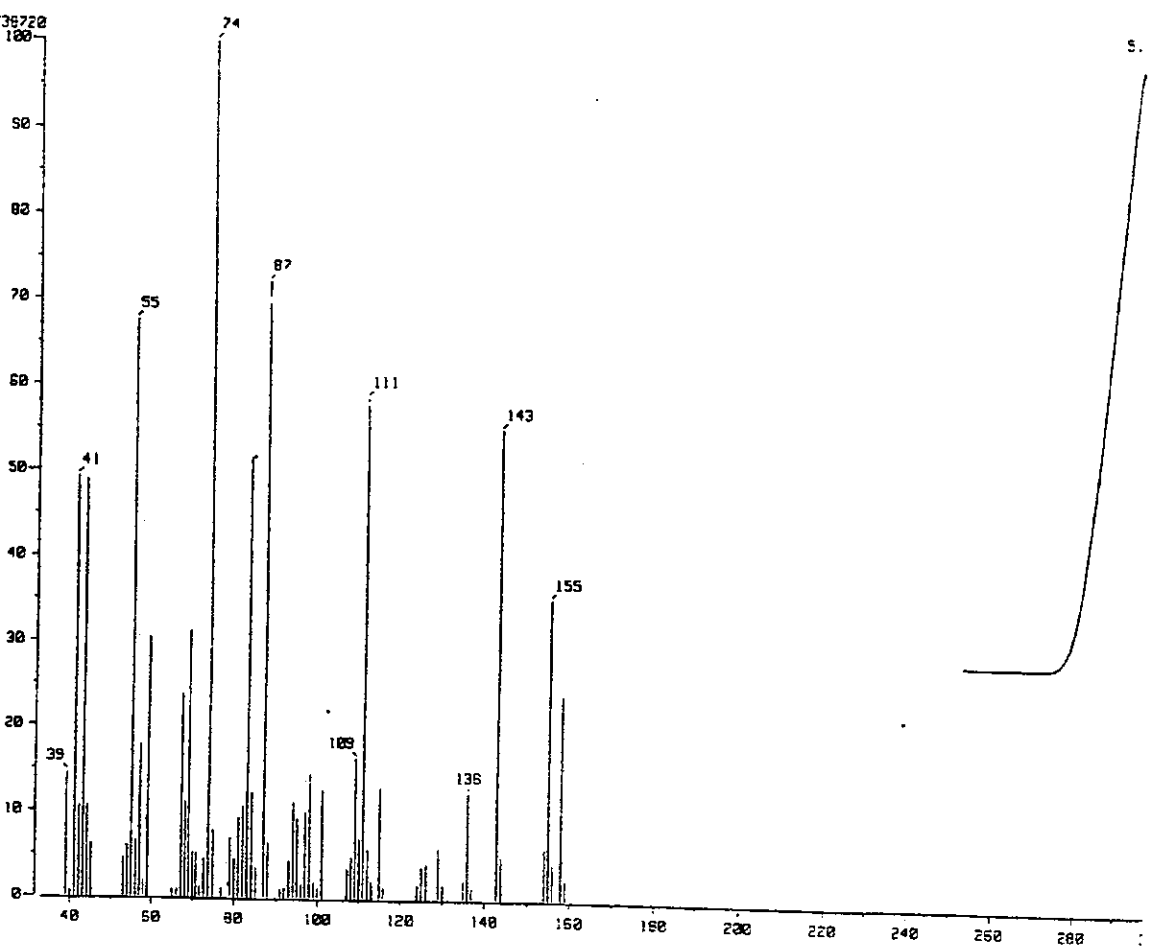
- ☞ Fay J. P, Farias R. N, Inhibitory action of a non metabolizable fatty acid on the growth of *Escherichia coli*: role of metabolism and outer membrane integrity. *J. Bacteriol*, 42, 32, (1977).
- ☞ Field, L. h, Parker, Effects of fatty acids on growth of *Bordetella pertussis* in defined medium. *J Clin Microbiol*, 31, 54, (1979).
- ☞ Greeway, D. L. A, Mechanism of the Inhibitory Action of Linoleic Acid on the Growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology*. 115, 233, (1979).
- ☞ Kanetsuna, F, Bacterial effect of fatty acids on mycobacteria, with particular reference to the suggested mechanism of intracellular killing. *Microbiol Immunol* (1976).
- ☞ Kondo, Further studies on the lethal effect of long chain fatty acids on mycobacteria. *J. Med Sci Biol*, (1977).
- ☞ Kondo, E. Kanai, K, The relationship between the chemical structure of fatty acids and their mycobacterial activity. *J. Med. Sci Boilogy*. 32, 41, (1977).
- ☞ Larry, R. Beucha, Antimicrobial Occurring Naturally in Foods. *Food Technology*, 21, 31, (1989).
- ☞ Leo. A, Paquette. 1992. *Fundamentos de Química Heterocíclica*. Editorial Limusa, Segunda edición. México D. F.
- ☞ Litter. A, Lemon peel oil extract as larvicide. *National Institute for Medical Research*, 71, 12 (1970).
- ☞ Lolita. R, Morore, F. Insecticidal properties of citrus oils against *Culex pipiens*. *Institute of Medical Entomology, Dokki. Cairo, Egypt*, 28, 2 (1980)
- ☞ Louis, Gilman, Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Quinta Edición. Editorial Interamericana, (1978).

- 📖 Markley, K. S. "Fatty Acids, Their Chemical and Physical Properties," John Wiley & Sons, Inc, New York, N.Y. 1947.
- 📖 Mckerrigan, A "Autoxidation and Flavor Determination of Fats," Journal. Soc. Chem. Ind., 39, 390-395 (1954).
- 📖 Miyake, M. Ozaki, Extraction of Neutral Limonoids from Citrus Seed. Journal Fruits Vegetables and Nuts Japan. 65, 987, (1990).
- 📖 Nishina, Revista de la Asociación de Estudios sobre Bactericidas y Fungicidas. 19, 401, (1991).
- 📖 O'Connor, R. T. "Fatty Acid Derivatives and Infrared Spectrophotometry" J. Am. Oil Chemists Soc. 33, 203- 218 (1956).
- 📖 Raymond, E. Kirk. Enciclopedia de la Tecnología Química. Unión topografica, Editorial Hispanoamericana. 1975.
- 📖 Ralston, A. W, "Fatty Acids and Derivatives." John Wiley & Sons, Inc, New York, N.Y. 1948.
- 📖 Sakamoto, S. Sato, Analysis of components in natural food additive Grapefruit seed extract by HPLC and LC|MS. Eise Shikenjo Hokoku. 58, 98, (1996).
- 📖 Schneirson, S. A simple Rapid Disk- tube Method For Determination of Bacterial Sensitivity To Antibiotics. Antimicrobial Chemother. 4, 12, (1954).
- 📖 Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, Centro de Estadísticas Agropecuarias Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos.

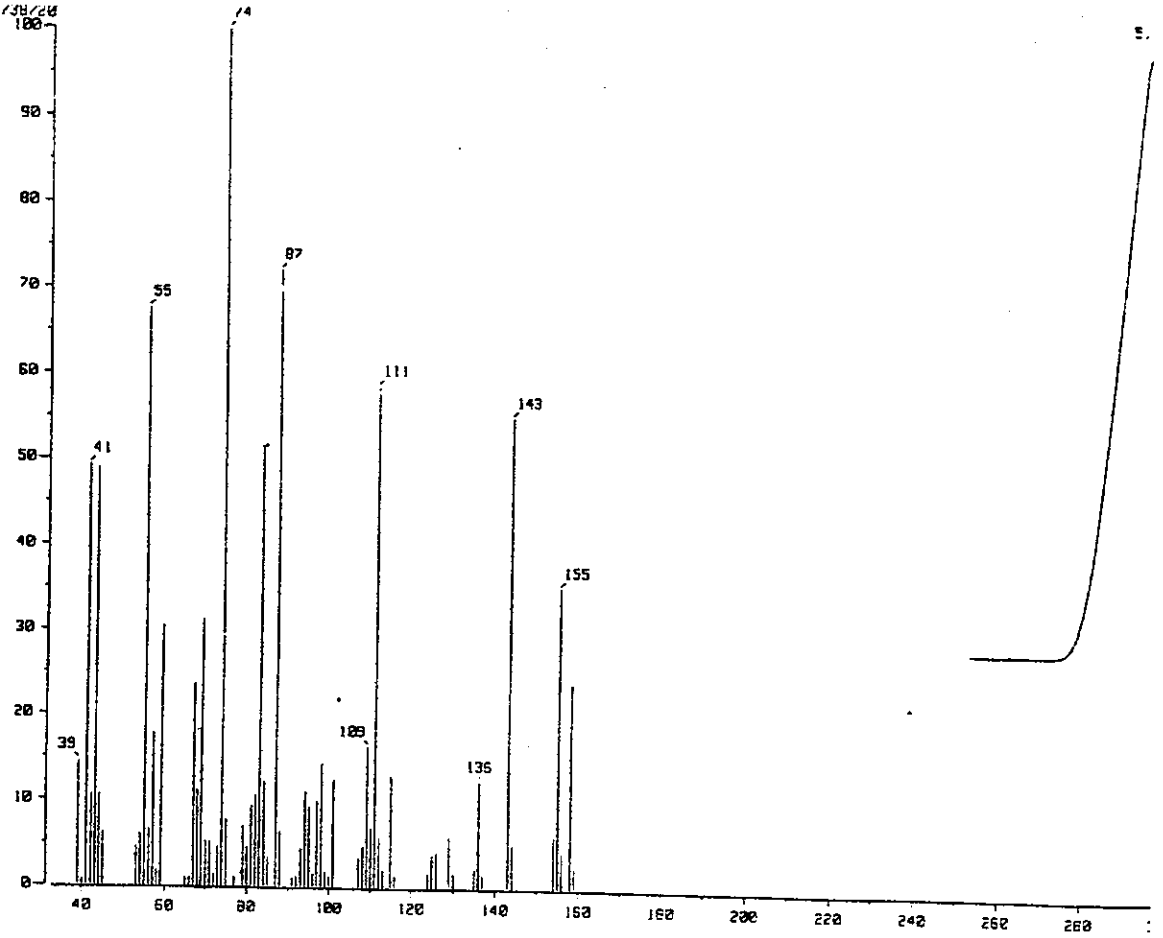
CROMATOGRAMA DE GASES DE LOS ACIDOS GRASOS DEL LIMON



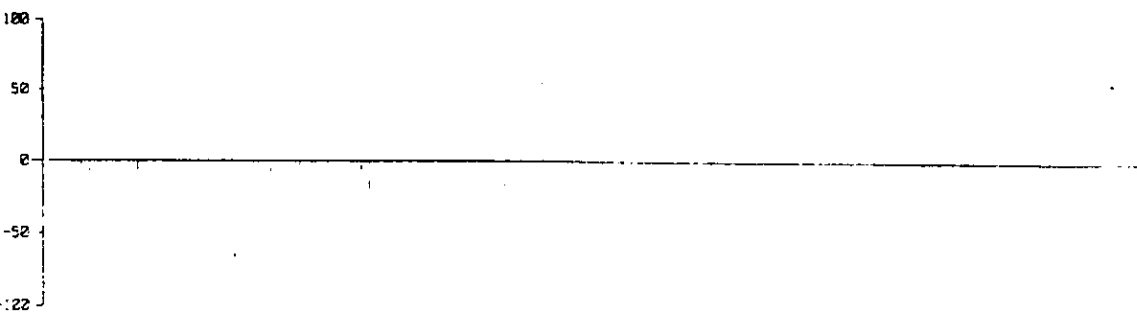
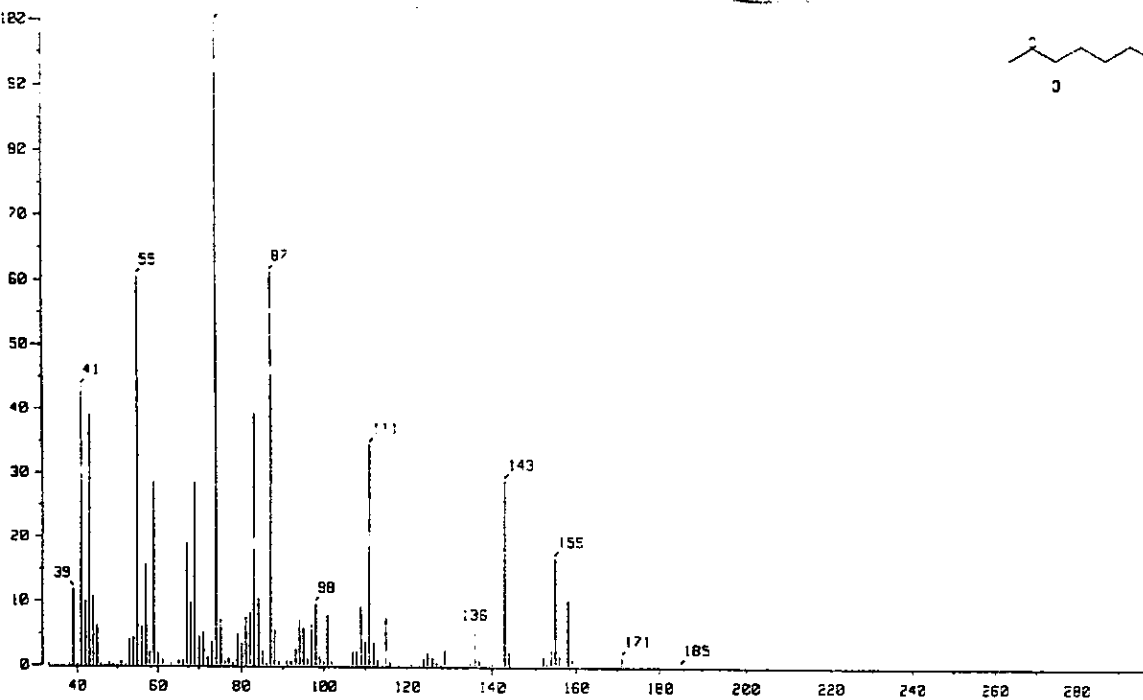
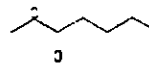
SPECTRO DE MASAS DE LOS ACIDOS GRASOS DEL LIMON



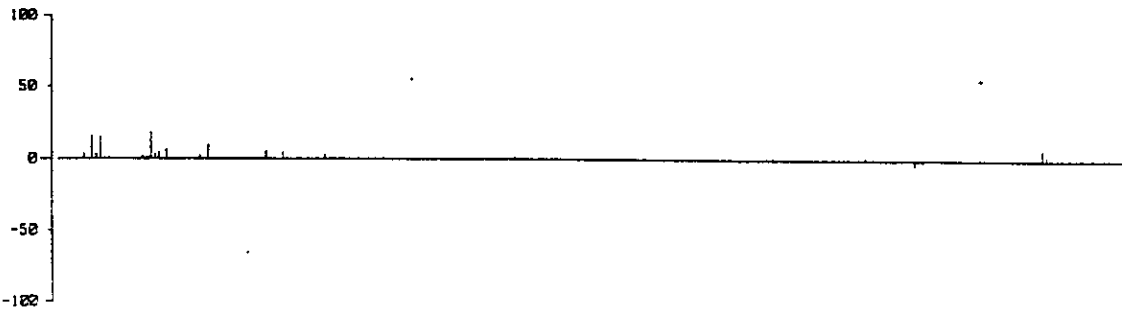
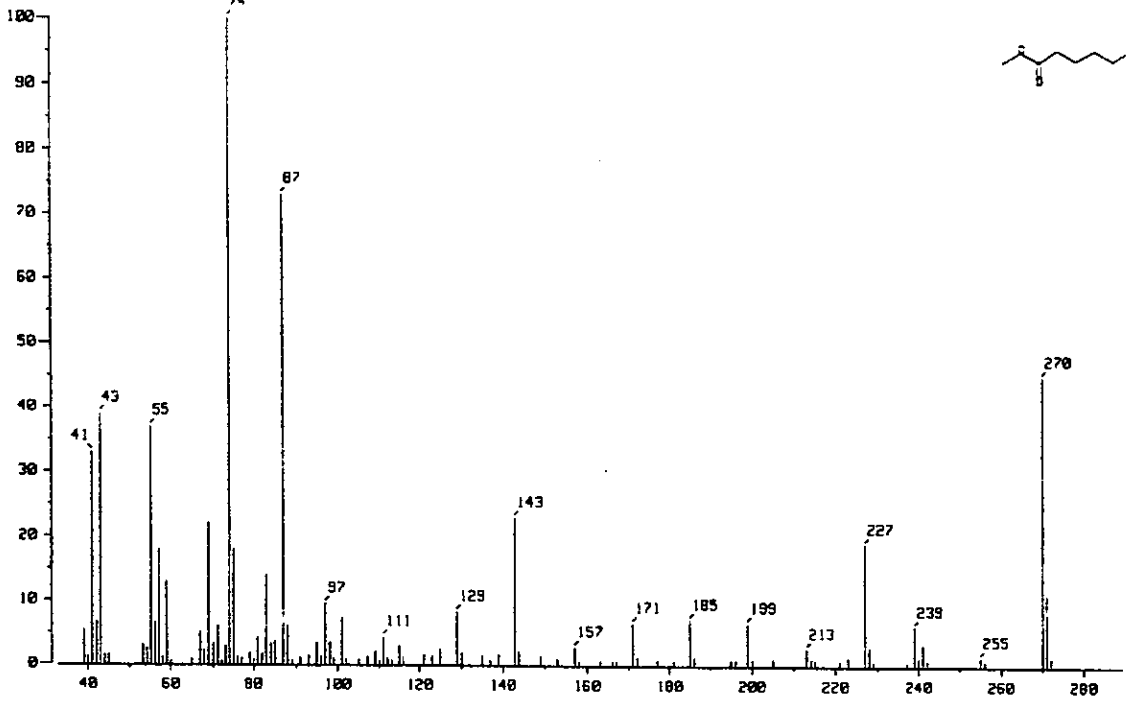
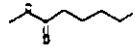
ESPECTRO DE MASAS DE LOS ACIDOS GRASOS DEL LIMON



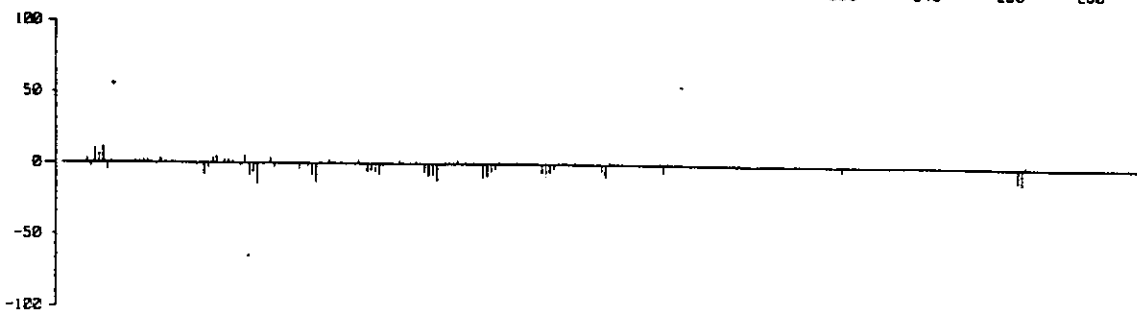
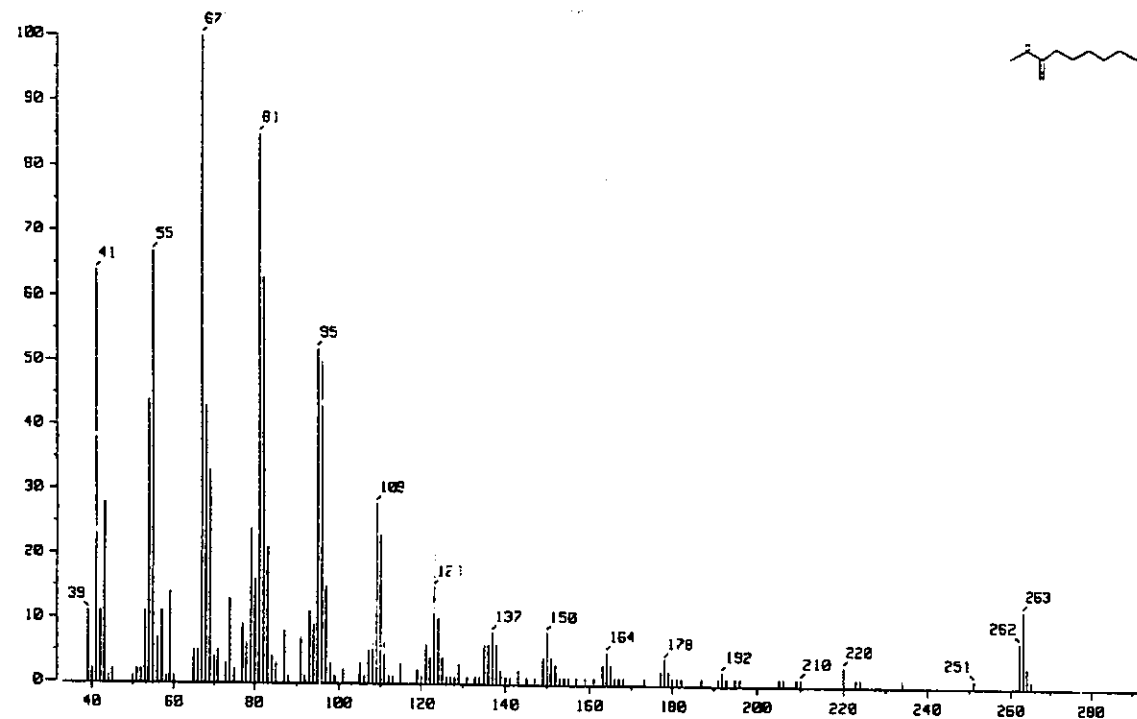
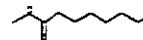
ESPECTRO: Nonanoic acid, 9-methy ester



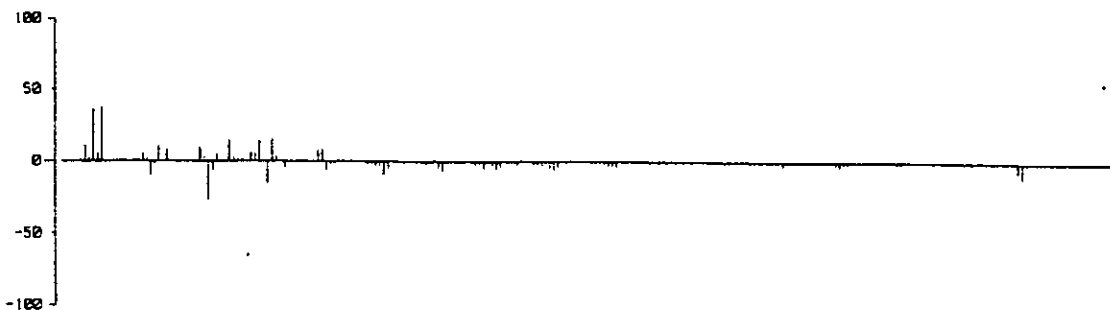
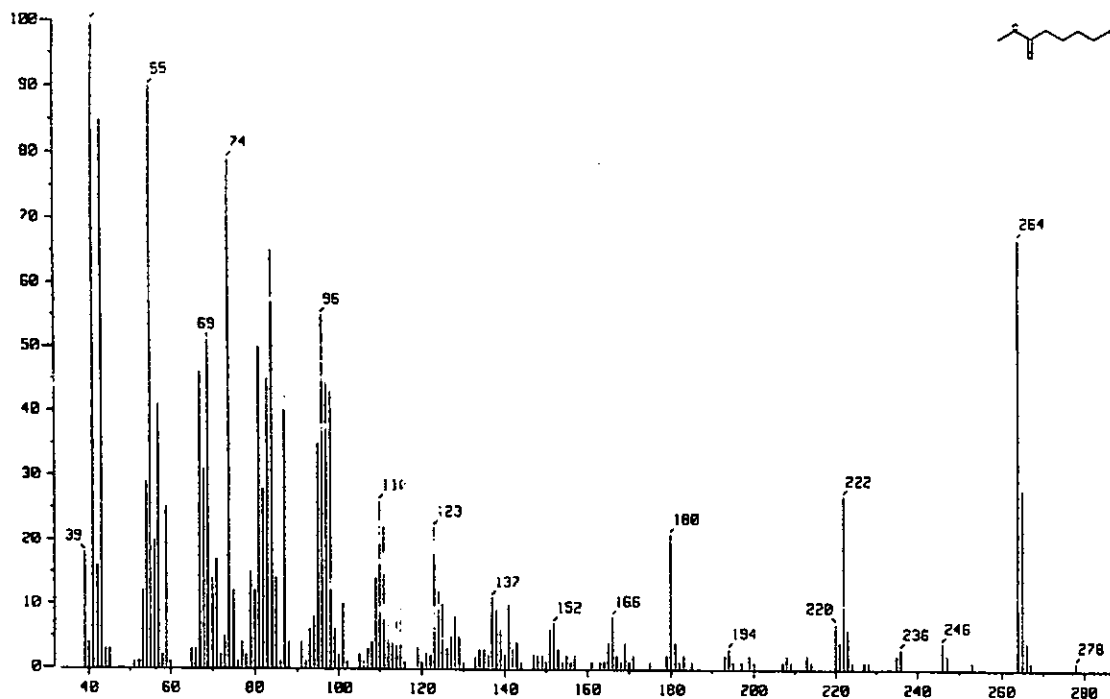
ESPECTRO: Pentadecanoic acid, 14 methy ester



ESPECTRO: 11,14- Octadecadienoic acid methy ester



Espectro: 6,-Octadecanoic acid, methy ester



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA