



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA



“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus paradisi* L. (TORONJA) DE BACTERIAS AISLADAS DE *Iguana iguana* (IGUANA VERDE) EN CAUTIVERIO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

BRENDA ITZEL ROMERO COLMENERO

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. FELIPE CORREA SÁNCHEZ

Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla Edo. De México, 2020



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.

DEDICATORIAS

Mi trabajo es dedicado con todo mi amor para toda mi familia, pero en especial a mis padres y hermanas, son mi mayor felicidad y mi motor para seguir adelante cada día, aunque los días se tornen difíciles. Muchas Gracias por todo. Los amo.

A mis padres Virginia y Juan Carlos

Por siempre guiar mi camino con amor, comprensión y su apoyo incondicional para lograr cada una de mis metas. Por mantenerme siempre fuerte para no rendirme nunca.

A mis hermanas Karla y Yoselin

Por ser parte de mi vida y estar siempre conmigo en todo momento, por su apoyo y enseñanzas. Las admiro.

A mis amigos, compañeros y profesores

Gracias por ser parte de mi formación personal y académica.

A los animales

Por darme lecciones importantes y experiencias únicas, que muchas personas no ven o no valoran. Son mi mayor inspiración para continuar en esta hermosa carrera.

AGRADECIMIENTOS

Estoy muy agradecida con mi familia y con todas aquellas personas que me ayudaron directamente e indirectamente durante toda mi trayectoria escolar y en la realización de mi trabajo de tesis. Muchas Gracias.

A la UNAM

Por haberme brindado la oportunidad de estudiar en la máxima casa de estudios, por ser mi segundo hogar y darme experiencias maravillosas desde el primer día.

Al laboratorio de herpetología (vivario) y a los profesores que trabajan ahí

Por la confianza que me tuvieron para dejarme aprender sobre lo hermoso que es convivir con anfibios y reptiles, por las experiencias y conocimientos durante los diferentes eventos que ayudaron mucho en mi formación académica.

A mi director de tesis M. en C. Felipe Correa Sánchez

Por recibirme desde el servicio social y compartir sus conocimientos, por su paciencia, apoyo, tiempo y la confianza brindada durante todo el proyecto.

A mis asesores M. en C. Agustín Ruiz Cabrera, M. en C. Ricardo Rodríguez Vilchis, M.V.Z Eduardo Cid Méndez y a la M. en C. Marisol Ávila Romero

Muchas gracias por todas las enseñanzas y conocimientos que compartieron conmigo, por tomarse el tiempo para este proyecto, por toda su ayuda, paciencia y consejos. Así como facilitar los materiales necesarios y los espacios en cada uno de sus lugares de trabajo.

Mi admiración y respeto para mi director de tesis y asesores

Índice

	Pág.
DEDICATORIAS	2
AGRADECIMIENTOS	3
1.RESUMEN	8
2.INTRODUCCIÓN	10
2.1 Biodiversidad de reptiles en México	10
2.2 Características generales de los reptiles	10
2.3 Características de la iguana verde	12
2.4 Iguana verde en cautiverio	13
3. Afecciones en cautiverio	13
3.1 Las bacterias	14
4. Aceites Esenciales	16
4.1 <i>Citrus paradisi</i> (Toronja)	17
5. ANTECEDENTES	19
6. JUSTIFICACIÓN	20
7. OBJETIVO GENERAL	21
8. OBJETIVOS PARTICULARES	21
9. MATERIALES Y MÉTODOS	22
9.1. Extracto de aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> L. (toronja)	22
9.2. Obtención de muestras bacterianas	22
9.3. Inoculación bacteriana:	22
9.4. Tinción de Gram y morfología colonial	23
9.5. Pruebas de Sensibilidad	23
9.6. Evaluación antimicrobiana	24
10. RESULTADOS	24
10.1 Composición química del aceite esencial de <i>C.paradisi</i>	24
10.2. Observación del crecimiento bacteriano	27
10.3 Morfología Colonial	30
10.4 Frotis y Tinción Gram	31

10.5 Pruebas de sensibilidad y evaluación antimicrobiana.....	33
11. DISCUSIÓN	46
12. CONCLUSIONES	49
13. RECOMENDACIONES	50
14. ANEXO: TÉCNICAS UTILIZADAS	51
14.1 Extracción de Aceites Esenciales	51
14.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas	53
14.3 Morfología colonial	55
14.4 Tinción de Gram.....	56
14.5 Kirby- Baüer.....	58
15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1. Composición de las bacterias.....	15
Figura 2. Tinción de Gram (muestras de las iguanas que consumen toronja).....	31
Figura 3. Tinción de Gram (muestra de iguana que no consume toronja).....	32
Figura 4. Halos de inhibición (muestras de las iguanas que consumen toronja).....	33
Figura 5. Halo de inhibición (muestra de la iguana que no consume toronja).....	35
Figura 6. Halo de inhibición (muestra de la iguana que no consume toronja).....	36
Figura 7. Halo de inhibición (muestra de la iguana que no consume toronja).....	37
Figura 8. Inhibición de bacterias negativas con los diferentes medicamentos.....	38
Figura 9. Inhibición de bacterias positivas con los diferentes medicamentos.....	39
Figura 10. Proceso de extracción del aceite de toronja.....	52
Figura 11. Gráfica de la primer cromatografía del aceite esencial de Toronja.....	54
Figura 12. Gráfica de la segunda cromatografía del aceite esencial de Toronja....	55
Figura 13. Pasos para realizar la Tinción de Gram.....	57

Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Composición nutricional de <i>Citrus paradisi</i> (toronja).....	17
Tabla 2. Composición química de <i>Citrus paradisi</i> (toronja).....	18
Tabla 3. Compuestos químicos de la primer cromatografía de <i>Citrus paradisi</i> (toronja).....	25
Tabla 4. Compuestos químicos de la segunda cromatografía de <i>Citrus paradisi</i> (toronja).....	26
Tabla 5. Crecimiento bacteriano de las muestras de iguanas que comen toronja a 25°C por 48 hrs.....	27
Tabla 6. Crecimiento bacteriano de las muestras de iguanas que comen toronja a 25°C por 48 hrs.	27
Tabla 7. Crecimiento bacteriano de las muestras de iguanas que comen toronja a 37 °C por 24 hrs.	28
Tabla 8. Crecimiento bacteriano de las muestras de iguanas que comen toronja a 37°C por 24 hrs.....	28
Tabla 9. Crecimiento bacteriano de las muestras de la iguana que no come toronja a 25°C por 24 hrs.	29
Tabla 10. Crecimiento bacteriano de las muestras de la iguana que no come toronja a 25°C por 24 hrs.	29
Tabla 11. Crecimiento bacteriano de las muestras de la iguana que no come toronja a 37°C por 24 hrs.	29
Tabla 12. Crecimiento bacteriano de las muestras de la iguana que no come toronja a 37°C por 24 hrs.	29
Tabla 13. Halos inhibitorios de las segundas muestras bacterianas.....	34
Tabla 14. Nombres, abreviaturas y cantidad administrada de los medicamentos utilizados en las muestras de iguanas que consumen toronja	40
Tabla 15. Nombres, abreviaturas y cantidad administrada de los medicamentos utilizados en las muestras de la iguana que no consume toronja.	43

Índice de Gráficos

Iguanas que consumen toronja

Pág.

Gráfica 1.Número de bacterias con rangos sensibles a los medicamentos.....41

Gráfica 2.Número de bacterias con rangos intermedios a los medicamentos.....42

Gráfica 3.Número de bacterias con rangos resistentes a los medicamentos.....42

Iguana que no consume toronja

Gráfica 4.Número de bacterias con rangos sensibles a los medicamentos.....44

Gráfica 5.Número de bacterias con rangos intermedios a los medicamentos.....45

Gráfica 6.Número de bacterias con rangos resistentes a los medicamentos.....45

1. RESUMEN

El manejo en cautiverio de la *Iguana iguana* (iguana verde) ha cobrado un enorme auge mundial, por eso es necesario mantener las condiciones adecuadas para los ejemplares, ya que cuando no son favorables pueden causar enfermedades, principalmente de tipo respiratorias y gastrointestinales, la mayoría de estas causadas por bacterias. Dentro del reino vegetal encontramos a *Citrus paradisi L.*, la cual es una planta cítrica, comúnmente conocida como toronja, que posee efectividad anti-inflamatoria, antitumoral, actividad antioxidante, antifúngica, antimicrobiana, entre otras. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus paradisi L.* (toronja) sobre bacterias aisladas de *Iguana iguana* (iguana verde) en cautiverio y para esto se realizó una extracción de aceite esencial por el método de arrastre de vapor (hidrodestilación) de todo el fruto de *Citrus paradisi*, se obtuvo 2 mL en la primera extracción y 3.35 ml en la segunda extracción, se realizaron dos cromatografías de gases acoplada a espectrofotometría en masas del aceite, obteniéndose en ambas extracciones que el componente más abundante fue el limoneno, con un 75.14% en la primera extracción y 69.92% en la segunda. El muestreo bacteriano se realizó de la región cloacal de 4 iguanas que consumen toronja y de 1 iguana que no consume toronja del laboratorio de herpetología (vivario). De las primeras muestras bacterianas solo 42 de los 89 aislamientos fueron sometidas a prueba de sensibilidad y de las segundas muestras bacterianas se sometieron a los 44 aislamientos bacterianos, a la prueba. A todos los aislamientos bacterianos encontrados se les realizó tinción Gram, morfología colonial y se sometieron a la prueba de sensibilidad (Kirby-Baüer) con el aceite esencial de *Citrus paradisi L.*, aceite de oliva y los multidiscos Bio-rad con diferentes antibióticos (los dos últimos como controles). En los sensidiscos se colocaron 10 y 15 µl de aceite esencial de *Citrus paradisi L.*, 5 µl del aceite de oliva y para los medicamentos de los multidiscos Bio-rad, ya venían estandarizados para la prueba con 5, 10, 15, 25, 30, 100 y 300 µg, se incubaron a 37°C por 24 hrs. Se obtuvo como resultado, que el aceite esencial de *Citrus paradisi L.* (toronja), si mostró actividad antibacteriana, en los aislamientos provenientes de la iguana que no se alimenta de toronja, pero aún no es significativo ya que menos de la mitad de las bacterias (43.18%) presentó un efecto, en los aislamientos de las muestras provenientes de las iguanas que comen toronja no mostraron efectividad antibacteriana.

A pesar de esto se concluye que se obtuvo un avance importante en cuanto a pruebas antimicrobianas en reptiles a nivel cautiverio y se considera que los componentes de *Citrus paradisi* tienen funciones selectivas en la microbiota de la iguana y que cuando la iguana no tiene este tipo de dieta los componentes bacterianos son tanto sensibles como resistentes al principio activo como se muestra en los resultados.

Palabras Clave: Bacterias aisladas, *Iguana iguana*, efecto antibacteriano, aceite esencial de *Citrus paradisi* L.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Biodiversidad de reptiles en México

“México es uno de los países con mayor diversidad biológica del mundo y con un alto grado de endemismo, entre 10 y 12% de las especies del planeta se encuentran en el territorio, sumando más de 200 mil especies, lo que lo posiciona como el cuarto país megadiverso en el mundo” (1).

“En México se encuentran 864 especies de reptiles, de los cuales 417 son lagartijas, 393 serpientes, 3 anfibios, 3 cocodrilos y 48 tortugas. Estas especies se incluyen en 159 géneros y 40 familias que representan el 8.7% de los reptiles del mundo” (2).

A medida que esta información se conoce, se resalta que los reptiles contribuyen mucho para el lugar privilegiado que ocupa nuestro país en estas especies. “Tiene mayor diversidad que toda Australia (686 especies), en Indonesia (alrededor de 600) y mucho más que en países tropicales considerablemente mayores como Brasil (467) e India (453)” (3).

“A nivel mundial, existen más de 7,984 especies de reptiles. De estas, un número considerable se mantienen en cautiverio como mascotas y en colecciones públicas o particulares con fines muy diversos, por lo que requieren de atención especializada para mantener o restablecer su estado de salud” (3).

2.2 Características generales de los reptiles

Los reptiles son vertebrados terrestres acuáticos o semiacuáticos cuyo origen data aproximadamente trescientos millones de años. “Fueron los primeros vertebrados en ocupar con éxito los diferentes hábitats terrestres” (4). Dentro de este grupo podemos encontrar especies inofensivas y otras con presencia de glándulas venenosas.

El término reptil proviene del latín *reperere* que significa “reptar” o “arrastrarse”, son organismos incapaces de regular su temperatura por si solos (ectotérmicos) dependen de la temperatura ambiental y de la presencia de dispositivos de calor, carecen de glándulas mucíparas, tienen la piel seca y están cubiertos de escamas que evita la evaporación de los líquidos internos (5).

Las patas son cortas (a veces ausentes o atrofiadas). La musculatura mandibular en reptiles aparece muy desarrollada y carecen de diafragma.

Todos los reptiles tienden a mudar, este es un proceso de cambio de la capa más externa de la piel, controlada por la glándula de la tiroides, que es necesaria para

permitir el crecimiento del animal, ya que son animales con crecimiento ilimitado, aunque es más lenta en la edad adulta. (4).

La circulación es vascular, cerrada, incompleta y doble, existe un circuito arterial y otro venoso, el corazón de los reptiles es tricavitario (2 aurículas y un solo ventrículo) con excepción de los cocodrilos, el cual es tetracavitario (2 aurículas y 2 ventrículos) “El desarrollo es directo no existe un estado larval; al nacer las crías son réplicas en miniatura de los adultos, el huevo amniota permite que el embrión se desarrolle dentro del mismo, protegido de la desecación del ambiente terrestre, la fecundación es interna. Hay una gran cantidad de especies ovíparas, aunque también se encuentran especies vivíparas” (5).

La respiración es pulmonar, en algunos grupos como en las serpientes, suelen tener uno de los pulmones atrofiados. “En los reptiles acuáticos los pulmones pueden ayudar en la flotación, en tortugas y otros escamados puede haber intercambio gaseoso a través de la mucosa bucal y las primeras presentan gran vascularización en la cloaca, donde desarrollan epitelio respiratorio” (4).

Poseen un sistema nervioso poco evolucionado y dos riñones formados por metanefros, los reptiles acuáticos excretan amoniaco y urea, los terrestres ácidos úricos y uratos. Los machos tienen dos testículos internos y hemipenes, las hembras presentan ovarios lobulados (6).

Los ojos de los reptiles pueden presentar parpados móviles o no. Los cocodrilos desarrollaron una membrana nictitante (tercer parpado) que tiene como función lubricar el globo ocular. La mayoría de los reptiles poseen glándulas lacrimales, cuya función es ayudar a limpiar. El sentido del gusto radica en las papilas de la lengua y el olfato es un sentido bien desarrollado en reptiles (4).

En la mayoría de los reptiles la dentición es homodonta y polifiodonta, sin embargo en algunos escamados existe diferenciación. Los reptiles poseen glándulas salivales, cuya función principal es lubricar a la presa. “El esófago es un tubo muy elástico que suele estar cubierto de epitelio ciliado, el estómago se correlaciona con la forma general del cuerpo del reptil. El sistema digestivo consta de dos glándulas accesorias: el hígado (producción del jugo biliar) y el páncreas (producción de jugos digestivos)” (4). La alimentación de los reptiles es variada, suelen ser carnívoros, insectívoros, herbívoros u omnívoros.

“Poseen una flora intestinal abundante. Principalmente enterobacterias, pseudomonadaceae y streptococcaceae” (6).

2.3 Características de la iguana verde

La iguana verde es un reptil escamoso de la familia Iguanidae, es conocida con el nombre científico de *Iguana iguana*, es un reptil de hábitos arbóreos, diurno, herbívoro, originario de los bosques húmedos tropicales de América Latina. “Es una de las especies de iguánidos más grandes que existen, en estado adulto pueden alcanzar hasta 2 m de longitud total. Tiene la cabeza ancha, oídos con tímpanos, hocico redondeado, con dientes pleurodontos, lengua móvil y protrusible (puede impulsarla fuera de la boca)” (7).

Sistemática

Clase: Reptilia

Subclase: Lepidosauria

Orden: Squamata

Suborden: Sauria /Lacertilia

Familia: Iguanidae

Género: Iguana

Especie: iguana

Tienen un ojo parietal, el cual actúa como célula fotosensible para permitirles captar si hay sol y la presencia de depredadores que puedan atacar desde arriba. “Si se toman de la cola, esta se desprende al igual que en las lagartijas, aunque después les vuelve a crecer, a este suceso se le llama autotomía” (8).

“Tienen una cresta dorsal que se extiende desde la cabeza hasta la cola que en los machos mide hasta 3 cm de altura, en las hembras es más pequeña, el número de escamas de la cresta dorsal es variable y se inserta hasta el músculo; tienen un pliegue angular no dilatado en el cuello, es una especie pentadáctila, con uñas en el extremo de los dedos, con propiedades prensiles que le permiten adherirse a las ramas de los árboles” (7).

Es un lagarto que posee un aparato digestivo alargado, consumen plantas, frutos y arbustos, se distribuye en las zonas donde solo hay bosque, prefiere los sitios templados ya que huyen del frío y buscan la época seca para su reproducción (9).

Presenta coloraciones variables que van desde el verde olivo a verde brillante y rojizo, con bandas transversas negras en el dorso hasta el vientre, separadas por rayas blanquecinas y en la cola anillos negros (7).

“En época de apareamiento los machos suelen ser muy territoriales, el apareamiento se repite cada año, de octubre a marzo con una fertilización interna. Una hembra pueden llegar a poner de 25 a 35 huevos, dependiendo el tamaño y la edad del ejemplar” (9).

2.4 Iguana verde en cautiverio

Actualmente el manejo en cautiverio de la iguana verde ha cobrado un enorme auge mundial, por eso es necesario mantener las condiciones adecuadas para los ejemplares.

El mantener organismos en cautiverio es de gran importancia para reproducir y preservar a las especies. Muchas poblaciones se han incrementado gracias al cautiverio. “Por otro lado, también nos permite acercarnos a conocimientos que en condiciones naturales difícilmente podríamos tener, el estar cerca de ellos nos permite entenderlos y sobre todo nos permite enseñar a otros a conocerlos y respetarlos” (10).

En el laboratorio de herpetología de la FES Iztacala (vivario), los encierros comprenden desde jaulas exteriores para iguanas, hasta pequeñas cajas de acrílico, vidrio, madera para pequeñas especies, adornado con accesorios como: troncos, rocas y plantas artificiales. La iluminación utilizada es de amplio espectro, la temperatura en estos organismos varía de 20 a 32 °C, para conservar la humedad dentro del encierro, se deja un bebedero limpio dentro del mismo o si es necesario se aspersa.

La alimentación para las iguanas verdes consiste en una mezcla de vegetales frescos que es preparada ahí mismo y ofrecida tres veces a la semana y una a dos veces por semana se les ofrece pellets (iguanabits) como alimento complementario.

3. Afecciones en cautiverio

Cuando no se tiene los cuidados necesarios al mantener animales en cautiverio, las condiciones suelen no ser favorables para las especies y pueden causar ciertas enfermedades como problemas de piel, nutricionales, neurológicos, respiratorios, reproductivos y digestivos.

Algunas de estas enfermedades son causadas por microorganismos como virus, bacterias, hongos, y parásitos, siendo las bacterias de las más comunes en reptiles.

“*Escherichia coli*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, *Vibrio*, han sido aislados de los problemas gastrointestinales de los reptiles, son parte de la flora normal, pero en deficientes condiciones, estos organismos oportunistas invaden a los hospedadores” (11).

3.1 Las bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares microscópicos, cosmopolitas, sin organelos membranosos como cloroplastos, mitocondrias y retículos, las bacterias disponen de cilios y flagelos para desplazarse. Por lo general presentan un tamaño de 0.5 a 5 micrómetros y diversas formas como esféricas (cocos), bastones (bacilos) en espiral o en forma de coma. Se reproducen asexualmente por división celular (12).

“Las estructuras comunes a todas o a la mayoría de las bacterias son pared celular, membrana plasmática y citoplasma, en este último se encuentra un ADN circular y numerosos ribosomas. La pared bacteriana da rigidez y forma a la célula; su componente molecular básica es el peptidoglicano” (13). Todas las bacterias crecen en colonias y comúnmente se clasifican según su aspecto macroscópico y microscópico. En el aspecto macroscópico se incluye los rasgos que definen las características de una colonia, como su color, su tamaño, forma y olor, mientras que en el aspecto microscópico, incluye la forma o agrupación y capacidad de captar la tinción de Gram (14).

La pared puede contener componentes como los lipopolisacáridos en las bacterias Gram negativas y los ácidos teicoicos en las bacterias Gram positivas. Las bacterias Gram positivas no tienen membrana externa ni espacio periplasmático, la red de mureina está más desarrollado, mientras que las bacterias Gram negativas son más complejas, tiene membrana externa y espacio periplasmático, que contiene componentes del sistema de transporte para el hierro, azúcares, diversas enzimas y otros metabolitos, la red de mureina es simple (14).

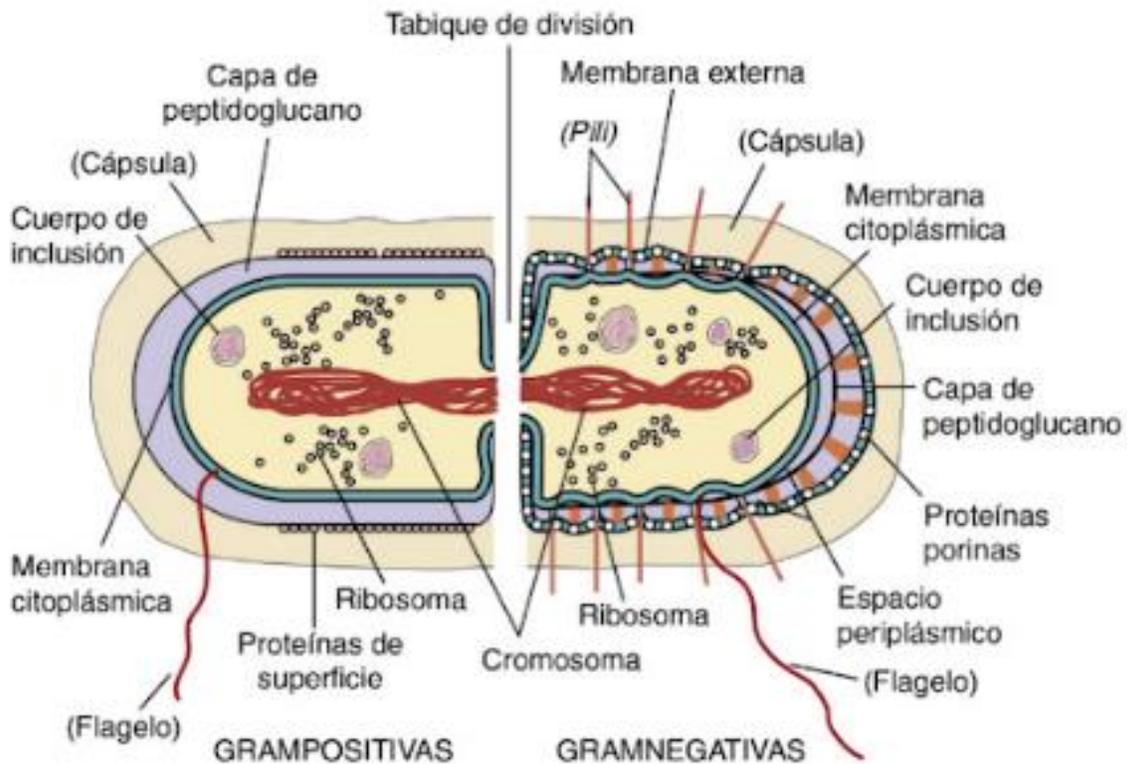


Figura 1. Composición de las bacterias. Las Grampositivas poseen una capa gruesa de peptidoglucano (relleno en color morado) (izquierda). Y las bacterias Gram negativas poseen una capa delgada de peptidoglucano (línea negra fina) y una membrana externa (derecha). Las estructuras cuyo nombre aparecen entre paréntesis no se encuentran en todas las bacterias (Murray *et al.*, 2016) (14).

4. Aceites Esenciales

“Los aceites esenciales son productos naturales pertenecientes al reino vegetal, están concentrados en sabores y aromas característicos, constituidos por combinaciones de hidrocarburos, compuestos oxigenados y residuos no volátiles que están contenidos en glándulas o vesículas secretoras sumergidas en los tejidos de las hojas, flores, corteza (pericarpio) y semillas de los frutos de muchas especies” (15).

“Los aceites esenciales obtenidos de frutos cítricos son mezclas de aproximadamente 100 componentes, los cuales dependen de la variedad de fruta y del método de extracción empleado, conteniendo de un 85 al 90% de compuestos volátiles y de 1 al 15% de compuestos no volátiles” (16).

Dentro de las propiedades físicas de los aceites esenciales tenemos:

Color: La mayoría de los aceites esenciales no poseen color en estado puro y frescos, ante la exposición al aire adquiere diversos colores.

Olor: Los aceites volátiles poseen un olor con variabilidad. El olor de un aceite es muy sensible ante la exposición al aire.

Sabor: Tienen grandes variabilidades, así como sus sabores pueden ser tan dulces, otros pueden ser suaves, picantes, ácidos, cáusticos o ardientes.

Densidad: La densidad de los aceites esenciales (entre 0.842 y 1.172 g/ml); la mayoría son más livianos que el agua.

Deterioro: La exposición a la luz y al aire deteriora la calidad y dañan la fragancia de los aceites esenciales.

Solubilidad: Son solubles en solventes orgánicos como alcohol, éter, cloroformo, benceno, entre otros (15).

Los aceites esenciales extraídos de plantas y frutas presentan actividad antimicrobiana frente a algunos microorganismos. “Considerando el gran número de diferentes compuestos químicos presentes en los aceites esenciales es importante decir que su actividad antimicrobiana no se atribuye a un mecanismo específico; sin embargo existen algunos sitios de acción en la célula en donde puede ocurrir daño a la membrana citoplasmática, degradación de la pared celular, daño a las proteínas, filtración del contenido celular, coagulación del citoplasma y disminución de la fuerza motriz” (17 y 18).

4.1 *Citrus paradisi* (Toronja)

“El *Citrus paradisi*, es una planta cítrica, comúnmente conocida como toronjo o toronja, que posee efectividad demostrada en la prevención de las patologías resultantes en degeneración progresiva del organismo, siendo usado de forma tradicional para aliviar gripes y resfriados, minimizando los síntomas de la enfermedad y acelerando la recuperación” (19).

“La Toronja crece en un ambiente tropical por lo general, son de color amarillo y globular, agrupados en racimos con un diámetro de 10 y 15 cm. Su pulpa es amarilla-clara, cubierta por una corteza” (15). Los componentes nutricionales y químicos varían según las características de la toronja y del tipo de extracción.

Elementos nutricionales

Tabla 1. Composición nutricional de *Citrus paradisi* (toronja) Fuente Gómez, 2015 (19).

Elemento	Cantidad
Hierro	0.17 mg
Proteínas	0.63 g
Calcio	23 g
Fibra	1.60 mg
Potasio	1.48 mg
Yodo	1.30 mg
Zinc	0.07 mg
Carbohidratos	7.41 g
Magnesio	9.60 mg
Vitamina A	1.80 ug
Vitamina B1	0.05 mg
Vitamina B2	0.02 mg
Vitamina B3	0.37 mg
Vitamina B5	0.27 ug
Vitamina B6	0.03 mg
Vitamina B7	0.35 ug
Vitamina B9	14 ug
Vitamina C	36 mg
Vitamina E	0.30 mg
Fósforo	16 mg
Calorías	36.63 kcal
Grasa	0.15 g
Azúcar	7.41 g

En cuanto a los componentes químicos, existen varios reportes acerca de la composición del aceite esencial de cáscaras de cítricos, algunas de las cuales incluyen entre las más importantes; terpenoides tal como el D-limoneno que tiene la propiedad antibacteriana y antifúngica de los aceites. El flavonoide más importante de la cáscara de la toronja es la naringina que dentro del organismo se convierte en naringenina con importantes propiedades antimicrobianas (15). En la siguiente tabla se muestran diferentes grupos como: ^a Monoterpeno, ^b Monoterpeno oxigenado, ^c Aldehído alifático, ^d Hidrocarburo alifático, ^e Sesquiterpeno, ^f Ester de ácido graso, ^g Otros hidrocarburos^h.

Tabla 2. Composición química de *Citrus paradisi* (toronja). Fuente Uysal *et al.*, 2011 (20).

No.	Componentes	Tiempo de retención (min)	Abundancia (%)
1	Nonano ^a	5.707	0.17 %
2	α -Pinoeno ^a	6.182	0.63 %
3	β -Felandreno ^a	6.709	1.18 %
4	β -Mirceno ^a	6.983	7.25 %
5	Octanal ^a	7.144	1.68 %
6	D-Limoneno	7.659	75.07 %
7	3 Careno ^a	7.836	0.21 %
8	Óxido de Linalol	7.968	0.31 %
9	Linalool ^b	8.247	0.48 %
10	Decanal ^e	9.307	1.11 %
11	Tetradecano ^e	10.18	0.26 %
12	Copaeno ^e	10.983	0.82 %
13	Tetradecano ^d	11.075	0.47 %
14	Cariofileno ^e	11.395	1.88 %
15	α -Cariofileno ^e	11.687	0.30 %
16	\hat{O} -Cadineno ^f	12.236	0.89 %
17	Palmitato de metilo ^f	16.505	0.31 %
18	Oleato de metilo ^f	18.410	0.19 %
19	Ftalato ^f	22.090	0.54 %
—	Total identificado (%)	Varios	95.26 %
	Otro ^e		4.74 %
	Rendimiento (%)		0.79 %
	Gravedad específica		0.883 %

5. ANTECEDENTES

-Algunos agentes patógenos bacterianos en reptiles de cautiverio fueron reportados por Aldana en el 2002, quien aisló 252 cepas bacterianas, encontrando *Shigella* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Citrobacter diversus*, *C. hafniae*, *Aeromonas calcoaceticusiwoffi*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia marcescens*, *S. ribidaea*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Enterobacter agglomerans*, *E. aerogenes*, *Klebsiella* sp. y *K. pneumoniae* (21).

-En 2011 Uysal y colaboradores, realizaron una extracción de aceites esenciales de *Citrus paradisi*, para inhibir ocho cepas bacterianas. Los resultados mostraron que el aceite esencial de cáscara de toronja tenía un amplio espectro de actividades antimicrobianas contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. marcescens* y *P. vulgaris*, con sus zonas de inhibición que van desde 11 a 53 mm (20).

-Soto y col., 2013, realizaron una extracción de aceite esencial de *Citrus paradisi* por el método de hidrodestilación, realizando una cromatografía de gases y espectrometría de masas. En esta obtuvieron 50 compuestos los cuales fueron separados e identificados, siendo el monoterpeno limoneno el componente más abundante con 70.04%, los aldehídos se encontraron en proporciones de 6.32% mientras que los alcoholes dieron un 7.77%. El sesquiterpeno más abundante fue E- cariofileno con 1.64% (16).

-Okunowo y col., en el 2013, realizaron una extracción de *Citrus paradisi*, al realizar la cromatografía indicaron que la cantidad de componentes del aceite esencial fue más alta con D-limoneno (75,05%), seguido de β -mireno (7,25%), α -pineno (2,11%), cariofileno (1,88%), octanal (1.68) y β -felandreno (1.18%). Algunos de los componentes menores incluyeron δ -cadineno (0,89%), copaeno (0,82%), ftalato de metilo (0,54%), linalool (0,48%) y 3-careno (0,21%). Como resultado obtuvieron que *Citrus paradisi* inhibe el crecimiento de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. marcescens* y *P. vulgaris*, entre otras bacterias y algunos hongos (22).

-Endara en el 2017, realizó un estudio sobre el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Citrus paradisi* sobre *Porphyromona gingivalis*, los resultados fueron significativos al presentar halos de inhibición al 75% y 100% de las concentraciones (15).

6. JUSTIFICACIÓN

Gracias al cautiverio la familia Iguanidae ha incrementado sus poblaciones pero lamentablemente los programas de manejo no se actualizan tan rápido y las condiciones pueden llegar a no ser favorables para las iguanas, sobre todo cuando hablamos de enfermedades que pueden ser mortales para éstas (21).

Las enfermedades en iguanas son causadas principalmente por inmunodepresión, traumatismo, estrés, desnutrición, ectoparásitos, endoparásitos y/o bacterias, estas últimas pueden estar presentes como integrantes de flora normal, invasores secundarios o agentes patógenos, entre las enfermedades asociadas a este último caso se encuentran estomatitis, neumonía, salmonelosis, abscesos, infecciones de piel como la dermatitis y septicemia. De tal modo que la presencia de bacterias causa no sólo morbilidad sino incluso mortalidad sobre todo en cautiverio ya que las condiciones tales como la temperatura, la manipulación y el espacio en donde se tenga pueden no ser las adecuadas para estas, provocando cierto estrés que debilite al organismo y con ella cambie la flora o se dé la aparición de alguna enfermedad (21).

Los medicamentos que se emplean para combatir las bacterias en iguanas son escasos y complejos, además algunas bacterias han presentado cierta resistencia a los medicamentos, es por esto que se deben buscar otras alternativas para combatir bacterias de una manera práctica y más natural.

Actualmente la utilización de sustancias naturales ha sido de mayor importancia médica para tratar diversas enfermedades causadas por patógenos bacterianos, en donde el reino vegetal es sin duda el que ofrece mayor variedad de sustancias potencialmente útiles (metabolitos secundarios) encontrados en diversas partes de las plantas (23).

El uso de plantas medicinales se ha vuelto un remedio eficaz para tratar diferentes tipos de afecciones. Una planta medicinal es, por definición, aquella que contiene uno o más de sus estructuras elementos activos que pueden ser utilizados directamente como medicamentos o bien servir para la síntesis de fármacos (24).

Dentro de las plantas utilizadas encontramos a los cítricos como el limón, la naranja, la mandarina y la toronja. En la dieta de la iguana verde podemos encontrar *Citrus paradisi*. L. mejor conocida como toronja, la cual se ha reportado como un agente antibacteriano natural.

7. OBJETIVO GENERAL

-Evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Citrus paradisi L.* (Toronja) sobre bacterias aisladas de *Iguana iguana* (iguana verde) en cautiverio.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

-Extraer el aceite esencial de *Citrus paradisi L.* (Toronja).

-Obtener las muestras bacterianas de *Iguana iguana* (iguana verde).

-Cultivar y aislar las bacterias en diferentes medios de cultivo.

-Aplicar el aceite esencial de *Citrus paradisi L.* (Toronja) en las diferentes cepas bacterianas.

-Analizar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Citrus paradisi L.* (Toronja) para ver si existe una inhibición del crecimiento sobre las cepas bacterianas.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Extracto de aceite esencial de *Citrus paradisi* L. (toronja): Se realizaron dos extracciones de aceite esencial de *Citrus paradisi* L. (toronja) del fruto fresco, las cuales fueron realizadas en el laboratorio de farmacognosia de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por el método de arrastre de vapor (hidrodestilación). En la primera extracción se utilizaron 4 kg de toronja y en la segunda extracción 7.4 kg de toronja. El arrastre se dejó por 3 horas, posteriormente se recuperó el aceite en un frasco sellado con una pequeña porción de agua. Se congeló y una vez congelada el agua se aisló del aceite con ayuda de una micropipeta. Posteriormente se le realizó una cromatografía en gases, marca Agilent Technologies modelo 6850GC acoplada a espectrofotometría de masas, marca Agilent Technologies modelo 9575C VL MSD. Las condiciones fueron: temperatura del horno 70°-290°C, gas de acarreo He. Se corroboraron todos los compuestos del aceite de toronja de las dos cromatografías con la base de datos NIST versión 10, todo esto fue realizado en el laboratorio de Biogeoquímica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

9.2. Obtención de muestras bacterianas: El primer muestreo se realizó de un macho y una hembra de iguana verde (*Iguana iguana*) adultas del iguinario (exterior) y 2 machos del interior del laboratorio (Vivario) que se alimentan de toronja. El segundo muestreo se realizó de un macho adulto del interior del vivario, que no se alimenta con toronja. Todos los muestreos se realizaron con un hisopo introduciéndolo en la región cloacal. Otra muestra se tomó de la materia fecal (inmediata) de uno de los machos que se alimenta de toronja, las muestras se trasladaron al laboratorio en tubos con agua estéril.

9.3. Inoculación bacteriana: Se sembraron los medios por estría continua y cada una de las muestras se inoculó en 9 medios de cultivo con el fin de obtener mayor número de cepas (agar verde brillante, agar sangre, agar nutritivo, agar sabouraud, agar sulfito bismuto, agar mac conkey, agar tcbs, agar s-110 y agar cetrimida). Las muestras se incubaron a 24°C durante 48 hrs, revisándose cada 24 hrs. Después se incubaron a 37°C por 24 hrs y se refrigeraron las cajas a 2°C hasta su posterior revisión.

9.4. Tinción de Gram y morfología colonial: De las bacterias aisladas se observaron las características morfológicas de cada colonia en un principio para después realizar un frotis y tinción de Gram, posteriormente se observaron al microscopio.

9.5. Pruebas de Sensibilidad: Se sometieron a prueba 42 bacterias de las 89 aisladas de las cuatro iguanas que se alimentan de toronja, mientras que de la iguana que no se alimenta de toronja se aislaron 44 bacterias las cuales todas fueron sometidas a prueba.

Para la prueba de Kirby- Baüer se ocupó Agar Neomicina y en algunas Agar Müller Hinton. Se inocularon las bacterias con ayuda de hisopos estériles, encima se colocaban los sensidiscos cargados con aceite de oliva y el aceite esencial de *Citrus paradisi* en una caja Petri. Los sensidiscos se cargaron con el aceite esencial de *Citrus paradisi*, con 10 y 15 microlitros y del aceite de oliva fueron 5 microlitros, después se incubaron a 37°C por 24 hrs.

En otra caja Petri se inocularon las mismas bacterias arriba mencionadas y se colocó el multidisco comercial para antibiograma (bio-rad) que contenían 12 diferentes antibióticos para bacterias Gram positivas y otras 12 en el multidisco de las Gram negativas (nitrofurantoína, ceftriaxona, ampicilina, trimetropin-sulfametoxazol, cefotaxima, cefalotina, cefepime, levofloxacin, cloranfenicol, amikacina, gentamicina, netilmicina, ceftazidima, cefuroxima, dicloxacilina, eritromicina, pefloxacin, penicilina, tetraciclina) fijándolo bien en el agar con unas pinzas estériles, después se incubaron a 37°C por 24 hrs. Los antibióticos de los multidiscos bio-rad ya vienen estandarizados para las pruebas con 5, 10, 15, 25, 30, 100 y 300 µg.

La mayoría de los antibióticos fueron de amplio espectro pero había algunos que solo eran para bacterias Gram positivas o solo para Gram negativas. Los multidiscos negativos que se utilizaron con las muestras de la iguana que no come toronja, eran de color diferente ya que bio-rad actualizó los antibióticos.

Quitó ceftriaxona, cefepime, levofloxacin y añadió carbenicilina, norfloxacin, cefotaxima y ciprofloxacina.

9.6. Evaluación antimicrobiana: La evaluación del efecto antimicrobiano se realizó de manera cuantitativa, por medición del diámetro de los halos de inhibición de todas las muestras bacterianas sometidas al aceite esencial de *Citrus paradisi* y a los medicamentos.

También se realizó cualitativamente, siguiendo las pautas ya estandarizadas en la prueba de los multidiscos y para el aceite esencial por la clasificación de Duraffourd y colaboradores en 1983 (25) citado por Endara 2017 (15), quienes realizaron estudios estadísticos determinando tablas de actividad antimicrobiana. Estos consideran la actividad de los aceites esenciales en función al diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano (HICB):

- Nula (-), para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible = +) para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- Medio (muy sensible =++) para un diámetro entre 14 y 20 mm.
- Finalmente para un diámetro superior a 20 mm el microorganismo es sumamente sensible (+++).

10. RESULTADOS

10.1 Composición química del aceite esencial de *C.paradisi*

En las tablas 3 y 4 se muestran los diferentes grupos obtenidos de las dos cromatografías en gases, acopladas a espectrofotometría de masas. Como se puede observar se encontraron: monoterpenos^a, terpenos^b, hidrocarburos^c, aldehídos^d, sesquiterpenos^e, alcanos^f, alcoholes^g, otros hidrocarburos^h y ácidos grasosⁱ. De los cuales se resalta que en la primer tabla, el componente químico más abundante fue el limoneno^a con un 75.14%, seguido por el beta mirceno^c con un 5.18%, el octanal^d con 4.20%, azuleno 1,2,3,3a,4,5,6,7 octahidrodimetil^c con 3.30%, octacosano^g con 1.87%, cariofileno^e con 1.67%, α -Pineno^b con 1.47% y por último el decanal^d con 1.40%.

Tabla 3. Composición química de *Citrus paradisi* (toronja), de la primer cromatografía.

No.	Componentes	Tiempo de retención (min)	Abundancia (%)
1	α -Pino b	5.020	1.47 %
2	Biciclohexano 2ene,4 metil (1-1metil) h	5.429	0.40 %
3	Beta mirceno c	5.517	5.18 %
4	Octanal d	5.670	4.20 %
5	α -felandreno a	5.774	0.31 %
6	1,3- ciclohexadien 1- metil 4 (1-metil) h	5.878	0.15 %
7	Limoneno a	6.022	75.14 %
8	1,4-ciclohexadin,1-metil-4(-1 metil) h	6.271	0.20 %
9	2-furamentanol, 5,eteniltetraldehido, α ,5 trimetil g	6.391	0.74 %
10	Ciclohexano,1-metil-4(1 metil tilideno) h	6.535	0.20 %
11	1,6 Octadieno-3ol,3,7-dimetil h	6.599	0.94 %
12	3Ciclohexano-1-ol,4-metil-1(1-metil etil) h	7.425	0.18 %
13	Decanal d	7.513	1.40 %
14	2,6-Octadienal,3,7-dimetil b	7.826	0.37 %
15	2,6,Octadienal,3,7-dimetil (E) b	8.042	0.46 %
16	1-Ciclohexano-1-carboxialdehido d	8.227	0.15 %
17	Copaeno c	8.972	0.31 %
18	1HCiclopropanaftalaeno,1a,2,3,5, 6,7,7a,7b octahidrometil h	9.036	0.30 %
19	Cariofileno e	9.333	1.67 %
20	α -Cariofileno e	9.581	0.24 %
21	Naftalaeno 1,2,3,4,4a,5,8a- octahidro-7 metil-4 metileno h	9.645	0.16 %
22	1,6-Ciclooctadieno,1-metil-5 metileno-8- (-1metil etil) b	9.733	0.65 %
23	Naftalaeno,1,2,3,4,4a,5,6,8a-octa hidro- 4a,8-dimetil-2-2(1-metil etil) h	9.814	0.33 %
24	Azuleno,1,2,3,3a,4,5,6,7octahidrodimetil c	9.838	3.30 %
25	Naftalaeno,1,2,3,5,6,8a hexahidro-dimetil (1- metil etil) h	9.910	0.50 %
26	2Naftalaenomentol,1,2,3,4,4a,5,6,7- octahidro-alpha,8-tetrametil h	10.743	0.08 %
27	Eicosano f	15.713	0.17 %
28	Octacosano g	17.260	1.87 %

En la siguiente tabla se puede observar que el componente químico limoneno^a nuevamente fue el de mayor abundancia con un 69.92 %, después el beta mirceno^c con un 4.88%, el ocatanal^d con 2.62%, decanal^d con 1.94%, cariofileno^e con 1.48%, α -Pino^b con 1.27% y al final el 1,6-Octadieno-3-ol, 3,7-dimetil ^h con 1.08%.

Tabla 4. Composición química de *Citrus paradisi* (toronja), de la segunda cromatografía.

No.	Componentes	Tiempo de retención (min)	Abundancia (%)
1	1R- α -Pino ^b	4.972	1.27 %
2	Biciclo [3.1.0] hexano, 4-metil (1-metil etil) ^c	5.389	0.43 %
3	β - Mirceno ^c	5.477	4.88 %
4	Octanal ^d	5.638	2.62 %
5	α -Felandreno ^a	5.742	0.24 %
6	1,3-Ciclohexadín, 1-metil-4-(1-metil etil) ^h	5.854	0.19 %
7	D- Limoneno ^a	5.990	69.92 %
8	1,4-Ciclohexadín,1-metil-4- (1-meetil etil) ^h	6.247	0.26 %
9	Ciclohexano, 1-metil-4- (1-metil etilideno) ^c	6.511	0.17 %
10	1,6-Octadieno-3-ol, 3,7-dimetil ^h	6.575	1.08 %
11	Nonanal ^d	6.615	0.40 %
12	6-Octanal, 3,7-dimetil (R) ^d	7.048	0.09 %
13	3-Ciclohexano-1-ol, 4-metil-1- (1-metil etil) ^c	7.409	0.32 %
14	Decanal ^d	7.497	1.94 %
15	2,6-Octadienal, 3,7-dimetil (Z) ^b	7.810	0.17 %
16	2,6-Octadienal, 3,7-dimetil (E) ^b	8.026	0.35 %
17	1-Ciclohexano-1-carboxi aldehído, 4-(1-metil etenil) ^d	8.211	0.13 %
18	Biciclo[4.1.0] heptano, 3,7,7-trimetil ^h	8.651	0.13 %
19	Copaeno ^c	8.956	0.22 %
20	1HCiclopenta [1,3] ciclopropa benzeno, Octahidro-7-metil-3-metileno-4(1-metil etil) ^h	9.020	0.14 %
21	Cariofileno ^e	9.317	1.48 %
22	α -Cariofileno ^e	9.565	0.13 %
23	Naftalaeno, 1,2,3,5,6,7,8,8a –octahidro-1,8a – dimetil-7-(1-metil etil) ^h	9.790	0.11 %
24	Naftalaeno, 1,2,3,5,6,8a –hexahidro-4,7- dimetil-1-(1-metil etil) ^h	9.894	0.24 %
25	2 (3H) Naftalenona, 4,4a,5,6,7,8-hexahidro- 4,4a-dimetil-6-(1-metil etileno) ^h	12.010	0.47 %
26	Cia-13- Ácido octadecenoico ⁱ	13.004	0.23 %
27	13-Octadecenal, (Z) ^d	13.132	0.39 %
28	Eicosano ^f	15.657	0.11 %

10.2. Observación del crecimiento bacteriano

En las tablas (5 a la 8), se muestran los avances de crecimiento de las bacterias en los 9 diferentes medios de cultivo, obtenidas de las cuatro iguanas que consumen toronja.

Tabla 5. Crecimiento bacteriano de las muestras de iguanas que comen toronja a 25°C por 48 hrs.

Iguanas	Agar Sabourad	Agar Sulfito bismuto	Agar TCBS	Agar Verde brillante	Agar Nutritivo	Agar S-110
Hembra	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
Macho 1	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
Macho 2	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
Macho 3	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Tabla 6. Crecimiento bacteriano de las muestras de iguanas que comen toronja a 25°C por 48 hrs.

Iguanas	Agar Gelosa Sangre	Agar Mac Conkey	Agar Cetrimida
Hembra	Positivo	Positivo	Positivo
Macho 1	Positivo	Positivo	Negativo
Macho 2	Positivo	Positivo	Negativo
Macho 3	Positivo	Positivo	Negativo

Tabla 7. Crecimiento bacteriano de las muestras de iguanas que comen toronja a 37 °C por 24 hrs.

Iguanas	Agar Sabourad	Agar Sulfito bismuto	Agar TCBS	Agar Verde brillante	Agar Nutritivo	Agar S-110
Hembra	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Macho 1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Macho 2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Macho 3	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Tabla 8. Crecimiento bacteriano de las muestras de iguanas que comen toronja a 37°C por 24 hrs.

Iguanas	Agar Gelosa Sangre	Agar Mac Conkey	Agar Cetrimida
Hembra	Positivo	Positivo	Positivo
Macho 1	Positivo	Positivo	Positivo
Macho 2	Positivo	Positivo	Positivo
Macho 3	Positivo	Positivo	Positivo

En las tablas (9 a la 12), se muestra el crecimiento de las bacterias en los 9 diferentes medios de cultivo, obtenidas del macho que no consume toronja.

Tabla 9. Crecimiento bacteriano de las muestras de la iguana que no come toronja a 25°C por 24 hrs.

	Agar Sabourad	Agar Sulfito bismuto	Agar TCBS	Agar Verde brillante	Agar Nutritivo	Agar S-110
Macho 4	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo

Tabla 10. Crecimiento bacteriano de las muestras de la iguana que no come toronja a 25°C por 24 hrs.

	Agar Gelosa Sangre	Agar Mac Conkey	Agar Cetrimida
Macho 4	Negativo	Positivo	Positivo

Tabla 11. Crecimiento bacteriano de las muestras de la iguana que no come toronja a 37°C por 24 hrs.

	Agar Sabourad	Agar Sulfito bismuto	Agar TCBS	Agar Verde brillante	Agar Nutritivo	Agar S-110
Macho 4	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Tabla 12. Crecimiento bacteriano de las muestras de la iguana que no come toronja a 37°C por 24 hrs.

	Agar Gelosa Sangre	Agar Mac Conkey	Agar Cetrimida
Macho 4	Positivo	Positivo	Positivo

10.3 Morfología Colonial

La morfología de las colonias nos ayudó a identificar las diferentes cepas bacterianas y poderlas aislar de una manera más eficiente.

De las muestras bacterianas de las iguanas que consumen toronja se realizó la morfología de las 89 colonias encontradas, por cada medio de cultivo se encontraron de 1 a 5 colonias diferentes, que fueron anotadas de la más grande a la más pequeña, en la mayoría de los casos tenían coloraciones blancas (lechosas y grisáceas), rosas y amarillas. Los tamaños encontrados fueron variables (menores a 0.5 mm (puntiformes) hasta 6 mm las más grandes).

Para el tipo de elevación las que más dominaron fueron convexas bajas. En su mayoría fueron de forma redonda, aunque también había ovaladas, cuando la colonia tenía forma redonda sus bordes eran regulares y si era ovalada casi siempre era irregular. Predominaron las colonias translúcidas y brillantes.

De las 44 muestras bacterianas de la iguana que no consume toronja se encontraron por cada medio de cultivo de 1 hasta 10 colonias de bacterias diferentes, también fueron anotadas de la más grande a la más pequeña para separarlas. Los colores que se presentaron fueron: blanco (lechosas y transparentes), rosa, café oscuro, amarillo oscuro y café grisáceo. Los tamaños iban desde los 0.5 mm (puntiformes) hasta 8 mm la más grande.

Al igual que las primeras muestras la mayoría fueron convexas bajas, con forma redonda, pocas ovaladas, los bordes variaban (regulares e irregulares). La mayoría translúcida pero con variaciones brillantes y opacas.

10.4 Frotis y Tinción Gram

En la figura 2 A y 2 B, se observan dos colonias diferentes de las muestras bacterianas, vistas al microscopio de una de las cuatro iguanas que se alimenta con toronja, después de los frotis y las tinciones Gram realizadas.

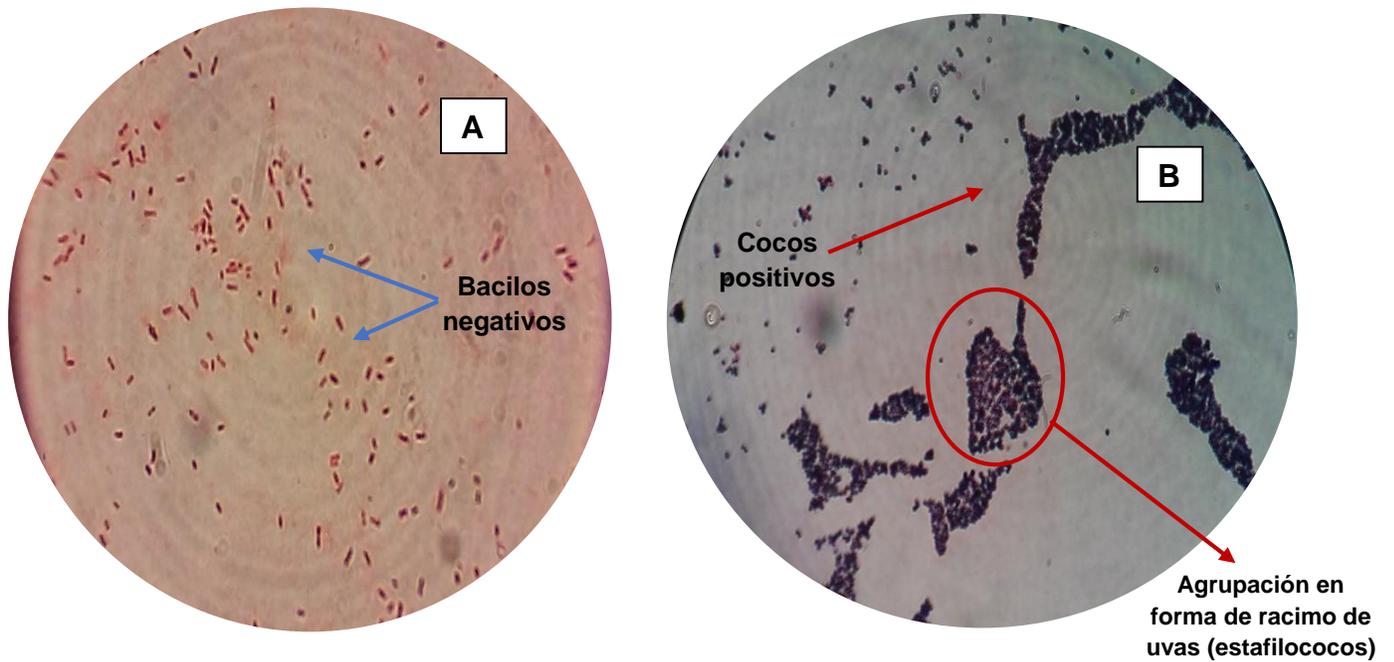


Figura 2. Tinción de Gram (muestras de las iguanas que consumen toronja). Macho del interior del vivario. 4 A) bacilos negativos, muestra de agar sulfito bismuto. 4 B) cocos positivos (posible estafilococos), muestra de agar S-110.

En la figura 3 A y 3 B, se observan dos colonias diferentes de bacterias vistas al microscopio, después de los frotis y las tinciones Gram realizadas (muestras de la iguana que no se alimenta de toronja).

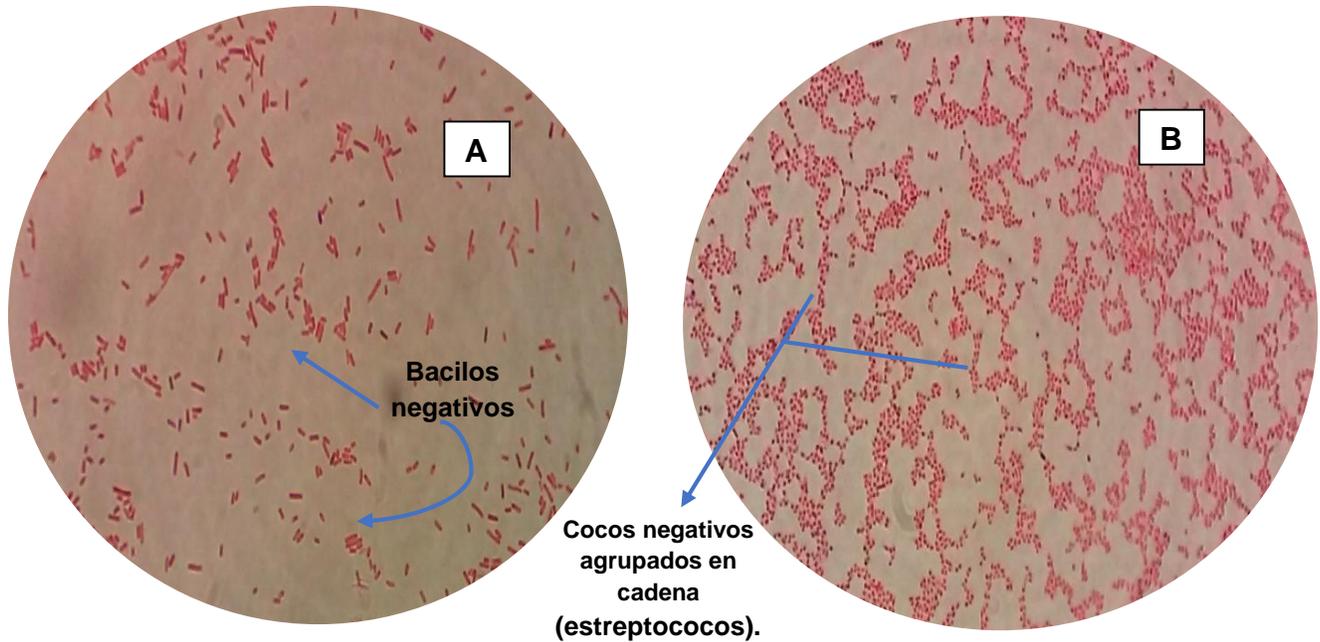


Figura 3. Tinción de Gram (muestra de iguana que no consume toronja). Macho del interior del vivario. 5 A) bacilos negativos, muestra de agar Saboraud. 5 B) cocos negativos, muestra de agar nutritivo (posible estreptococos).

10.5 Pruebas de sensibilidad y evaluación antimicrobiana

Se obtuvo una gran variedad de bacterias de las iguanas que comen toronja, fueron 40 bacterias negativas y 2 positivas de las cuales 22 fueron bacilos, 14 cocos y 6 bacilo-coco, también en estas muestras se observaron bacterias no Gram es decir bacterias que no se tiñen, por el tipo de pared que impide que entre el colorante. En las muestras de la iguana que no come toronja se encontraron 27 bacterias negativas y 17 positivas, encontrando 10 bacilos, 19 cocos, 13 bacilo-cocos y 2 sin distinción de su morfología.

- **Aceite esencial de *Citrus paradisi* (Toronja)**

De las 42 muestras bacterianas de las iguanas que consumen toronja sometidas al aceite de *Citrus paradisi* únicamente se observó en 2 (una Gram positiva y otra Gram negativa) de ellas un pequeño halo de inhibición. En la figura 4, se puede observar del lado derecho el círculo transparente alrededor del sensidisco.

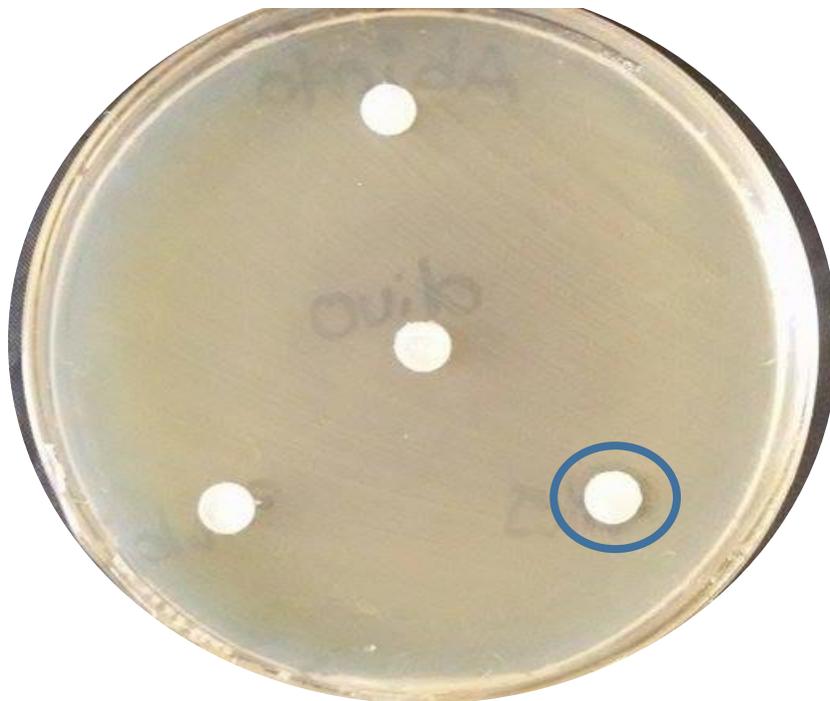


Figura 4. Halos de inhibición (muestras de las iguanas que consumen toronja) Bacteria Gram positiva con *Citrus paradisi* (toronja). Agar Neomicina. Con 10 μ l sin inhibición y a 15 μ l el halo fue de 5 mm.

En cuanto a las 44 muestras bacterianas de la iguana que no consume toronja sometidas a prueba con el aceite esencial de *Citrus paradisi*, 19 tuvieron halo de inhibición (12 Gram negativas y 7 Gram positivas). Dentro de estas 19 bacterias se encontraron 8 cocos, 5 bacilos, 5 bacilo-cocos y 1 que no se pudo distinguir su morfología. En la tabla 13, se muestra un listado de las bacterias que tuvieron halo de inhibición con 15 µl del aceite esencial.

Tabla 13. Halos inhibitorios de las segundas muestras bacterianas. Se muestra los halos de inhibición, el más pequeño fue de 7 mm y el más grande de 20 mm.

Agar y número de cepa	Bacteria	Diámetro del halo
Agar chocolate (1)	bacilos negativos	7 mm
Agar chocolate (2)	coco- bacilos negativa	7 mm
S-110 (2)	cocos positivos	8 mm
S-110 (6)	cocos positivos	9 mm
Verde Brillante (5.1)	bacilos negativos	9 mm
S-110 (5)	cocos positivos	10 mm
S-110 (7)	cocos positivos	10 mm
Verde Brillante (4.1)	cocos negativos	10 mm
Sulfito Bismuto (única)	bacilos negativos	10 mm
Agar TCBS (10)	cocos positivos	10 mm
Agar TCBS (6)	cocos positivos	11 mm
Mac Conkey (2)	coco-bacilos negativos	11 mm
Verde Brillante (4.2)	bacilos negativos	11 mm
Verde Brillante (7)	cocos negativos	11 mm
Verde Brillante (1)	No se distingue negativos	12 mm
Verde Brillante (2)	coco-bacilos negativos	12 mm
Verde Brillante (6)	bacilo-cocos negativos	13 mm
S-110 (4)	bacilo-cocos positivos	17 mm
Verde Brillante (3)	bacilos negativos	20 mm

En las figuras 5, 6 y 7, se muestran algunas bacterias con halo de inhibición, de las muestras de la iguana que no consume toronja.



Figura 5. Halo de inhibición (muestra de la iguana que no consume toronja). Bacteria Gram positiva con *Citrus paradisi* (toronja), en Agar Neomicina. Con 10 microlitros el halo fue de 14 mm y en 15 μ l fue de 17 mm.



Figura 6. Halo de inhibición (muestra de la iguana que no consume toronja). Bacteria Gram negativa con *Citrus paradisi* (toronja), en Agar Neomicina. Con 15 μ l el halo fue de 12 mm.



Figura 7. Halo de inhibición (muestra de la iguana que no consume toronja). Bacteria Gram negativa con *Citrus paradisi* (toronja), en Agar Neomicina. Con 15 μ l el halo fue de 11 mm.

- **Multidiscos**

Los halos de las primeras muestras (iguanas que comen toronja) fueron de 33 mm los más grandes y 10 mm los más pequeños, mientras que en las segundas muestras (iguana que no come toronja) los halos más grandes fueron de 33 mm o con expansión total y los más pequeños 11 mm.

En la figura 8 A y B, se muestran los halos de inhibición de los diferentes antibióticos.

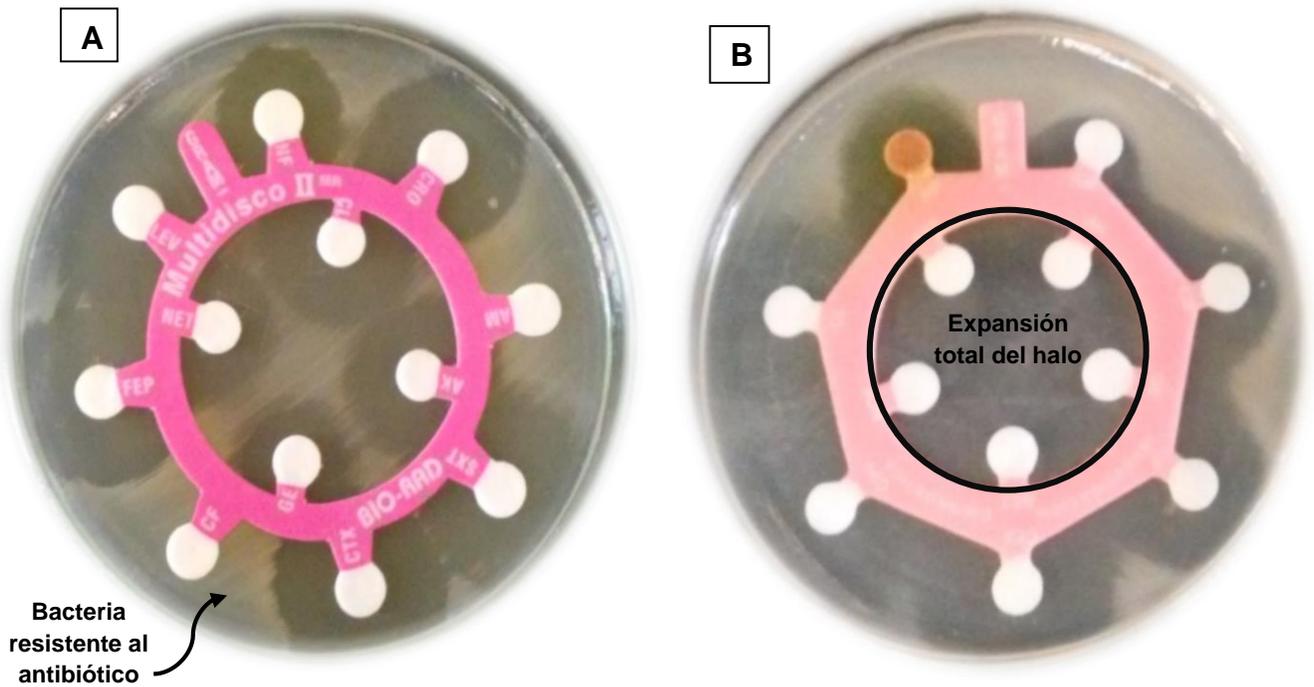


Figura 8. Inhibición de bacterias negativas con los diferentes medicamentos. Agar Neomicina. A) Multidisco que se ocupó en las primeras muestras. B) Multidisco que se ocupó en las segundas muestras.

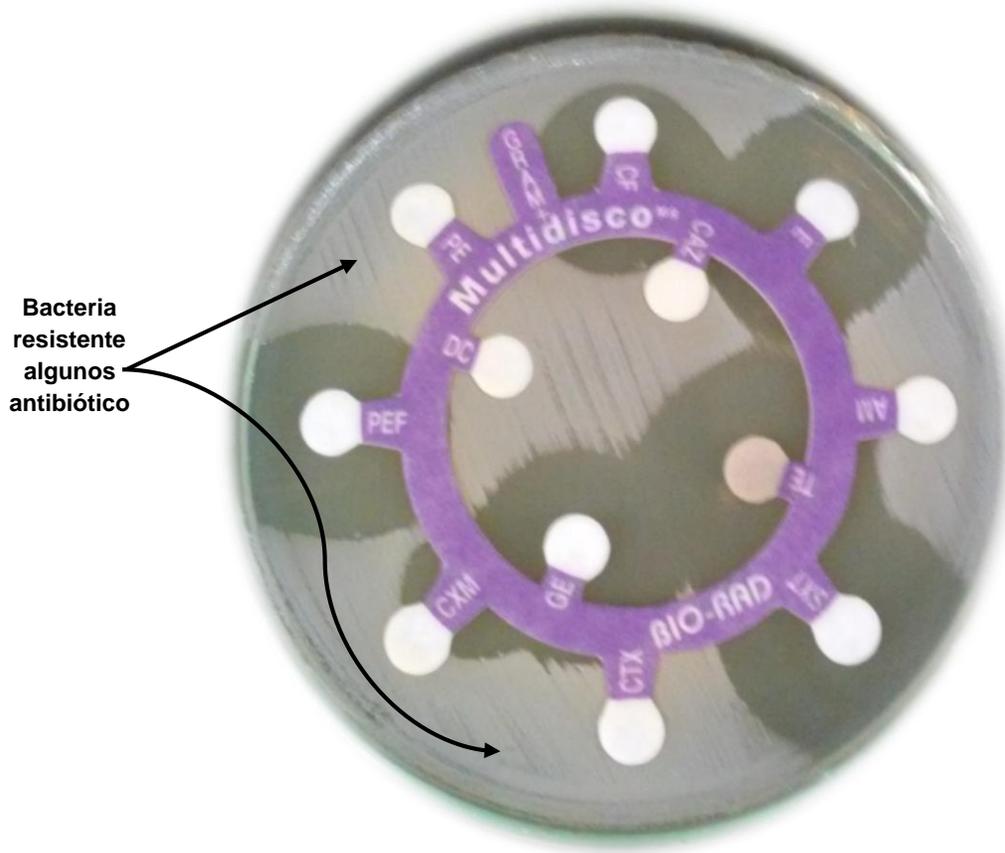


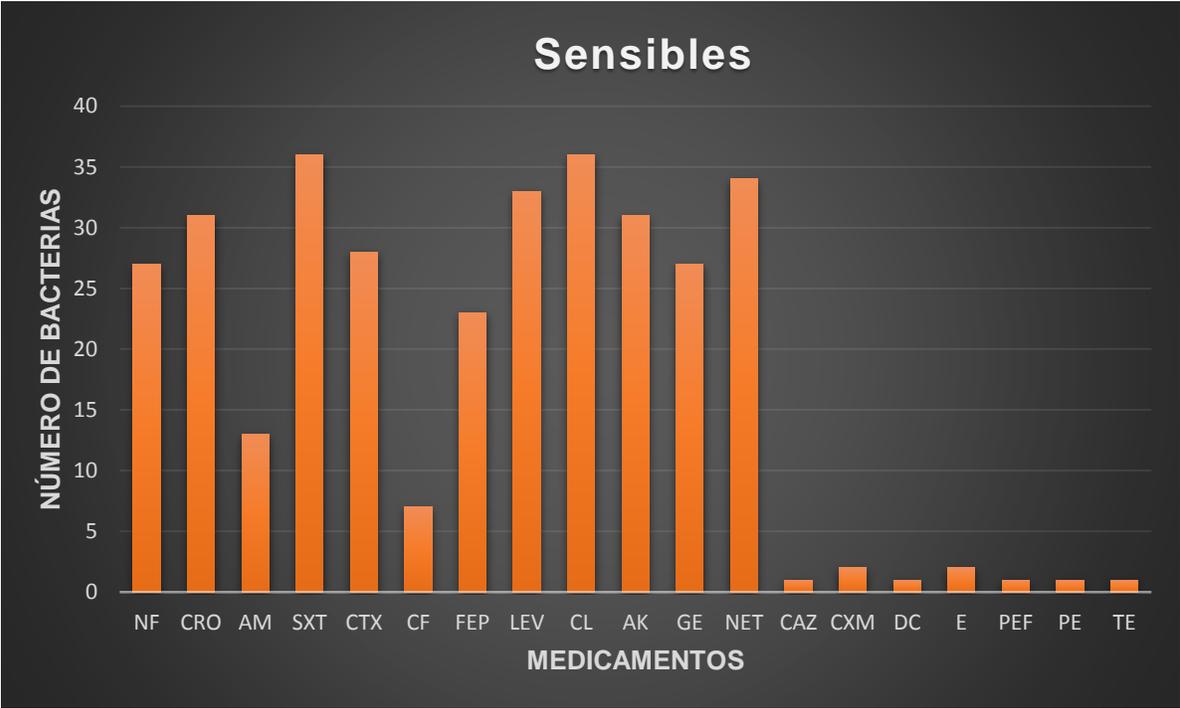
Figura 9. Inhibición de bacterias positivas con los diferentes medicamentos. Multidisco utilizados, en agar Neomicina. Se utilizó para todas las muestras (iguana que comen e iguana que no come toronja).

En la tabla 14, se muestran los medicamentos que se ocuparon para las muestras de las iguanas que consumen toronja.

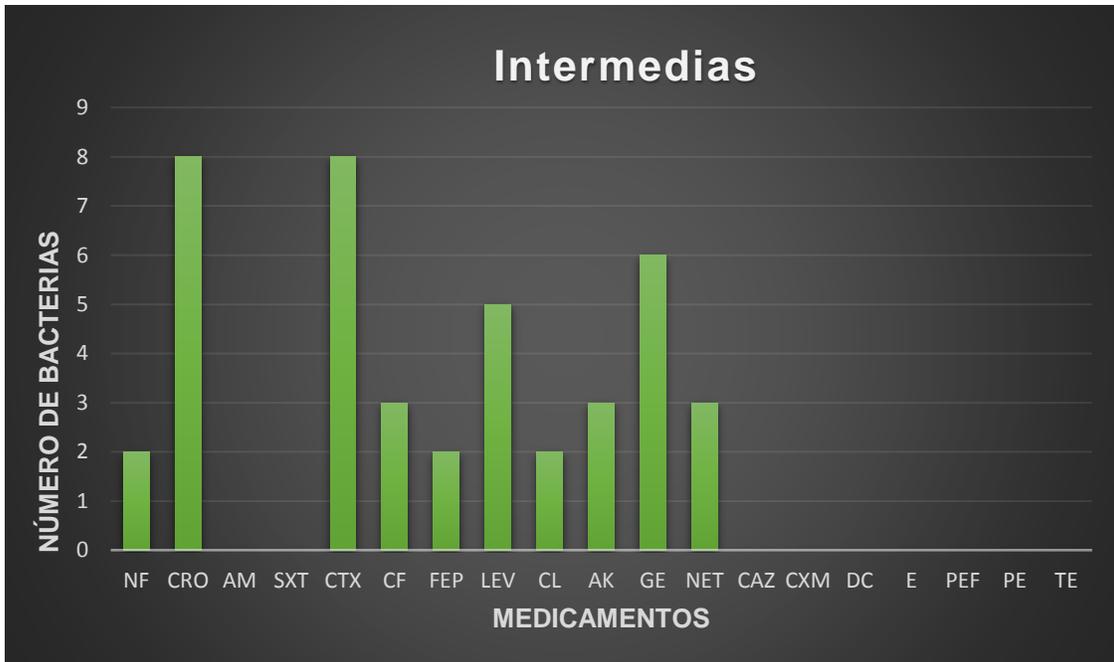
Tabla 14. Nombres, abreviaturas y cantidad administrada de los medicamentos utilizados en las muestras de iguanas que consumen toronja.

Nombre completo	Abreviación	µg
Nitrofurantoína	NF	300
Ceftriaxona	CRO	30
Ampicilina	AM	10
Trimetropin-Sulfametoxazol	SXT	25
Cefotaxima	CTX	30
Cefalotina	CF	30
Cefepime	FEP	30
Levofloxacina	LEV	5
Cloranfenicol	CL	30
Amikacina	AK	30
Gentamicina	GE	10
Netilmicina	NET	30
Ceftazidima	CAZ	30
Cefuroxima	CXM	30
Dicloxacilina	DC	1
Eritromicina	E	15
Pefloxacina	PEF	5
Penicilina	PE	10
Tetraciclina	TE	30

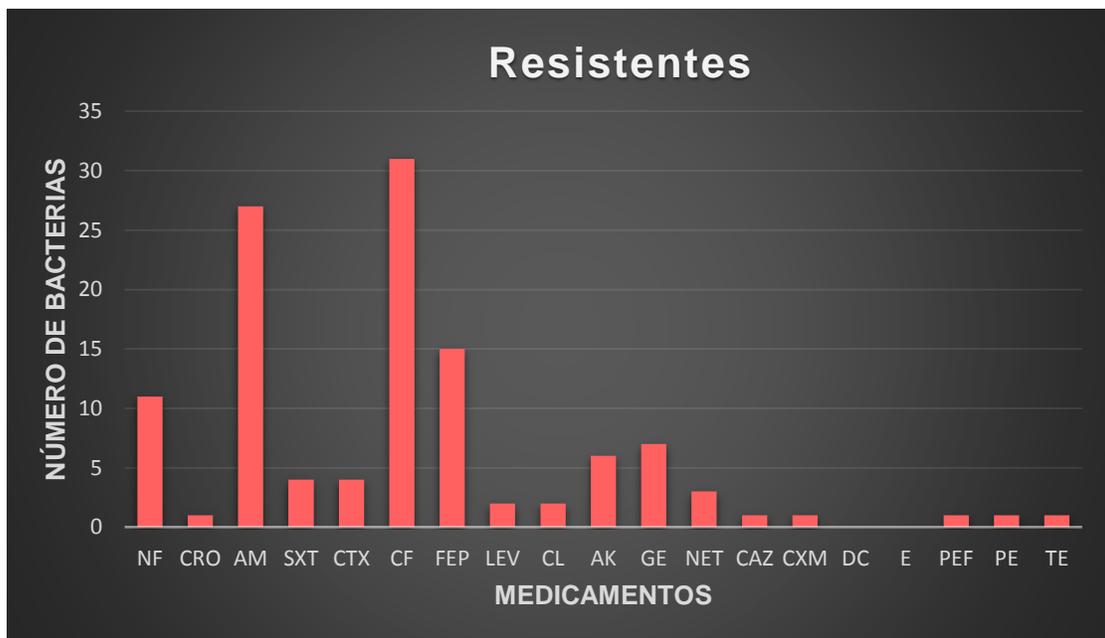
Al finalizar las pruebas de sensibilidad con los multidiscos, se realizó un conteo para separar el número de bacterias que habían sido sensibles, intermedias o resistentes a los diferentes antibióticos a los que fueron sometidas. Las gráficas (1 a 3), muestran los resultados de las bacterias que se sometieron a prueba, de las muestras de las iguanas que consumen toronja.



Gráfica 1. Número de bacterias con rangos sensibles a los medicamentos. Muestra el número de cepas bacterianas que mostraron sensibilidad a los medicamentos que fueron sometidos.



Gráfica 2. Número de bacterias con rangos intermedios a los medicamentos. Muestra el número de cepas bacterianas que se encuentran en un rango intermedio con los medicamentos.



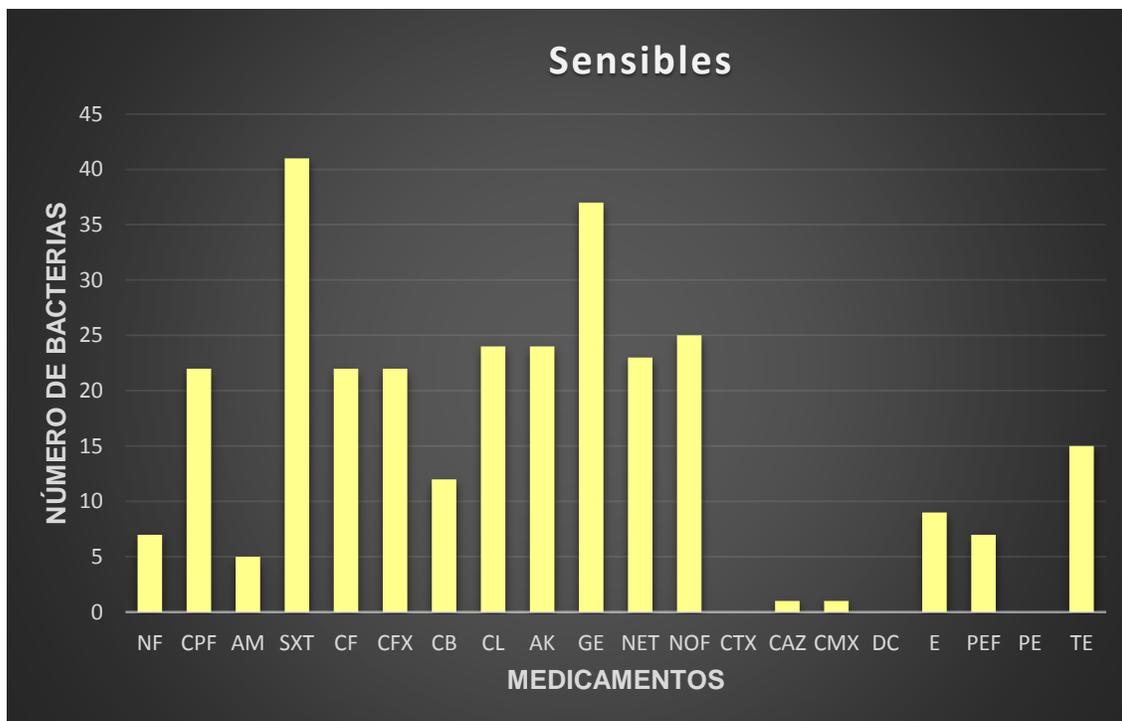
Gráfica 3. Número de bacterias con rangos resistentes a los medicamentos. Muestra el número de cepas bacterianas que presentaron resistencia a los medicamentos.

En la tabla 15 se muestran los medicamentos que se ocuparon para las muestras de la iguana que no consume toronja.

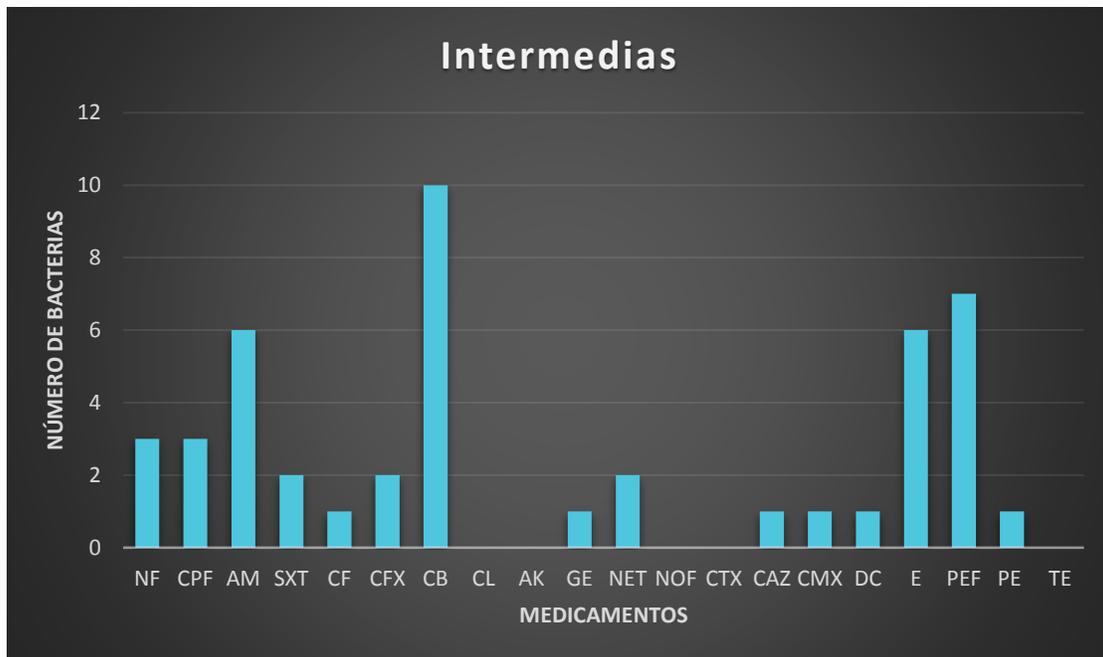
Tabla 15. Nombres, abreviaturas y cantidad administrada de los medicamentos utilizados en las muestras de la iguana que no consume toronja.

Nombre completo	Abreviación	µg
Nitrofurantoína	NF	300
Ciprofloxacina	CPF	5
Ampicilina	AM	10
Trimetropin-Sulfametoxazol	SXT	25
Cefotaxima	CTX	30
Cefalotina	CF	30
Cefotaxima	CFX	30
Carbencilina	CB	100
Cloranfenicol	CL	30
Amikacina	AK	30
Gentamicina	GE	10
Netilmicina	NET	30
Norfloxacina	NOF	5
Ceftazidima	CAZ	30
Cefuroxima	CXM	30
Dicloxacilina	DC	1
Eritromicina	E	15
Pefloxacina	PEF	5
Penicilina	PE	10
Tetraciclina	TE	30

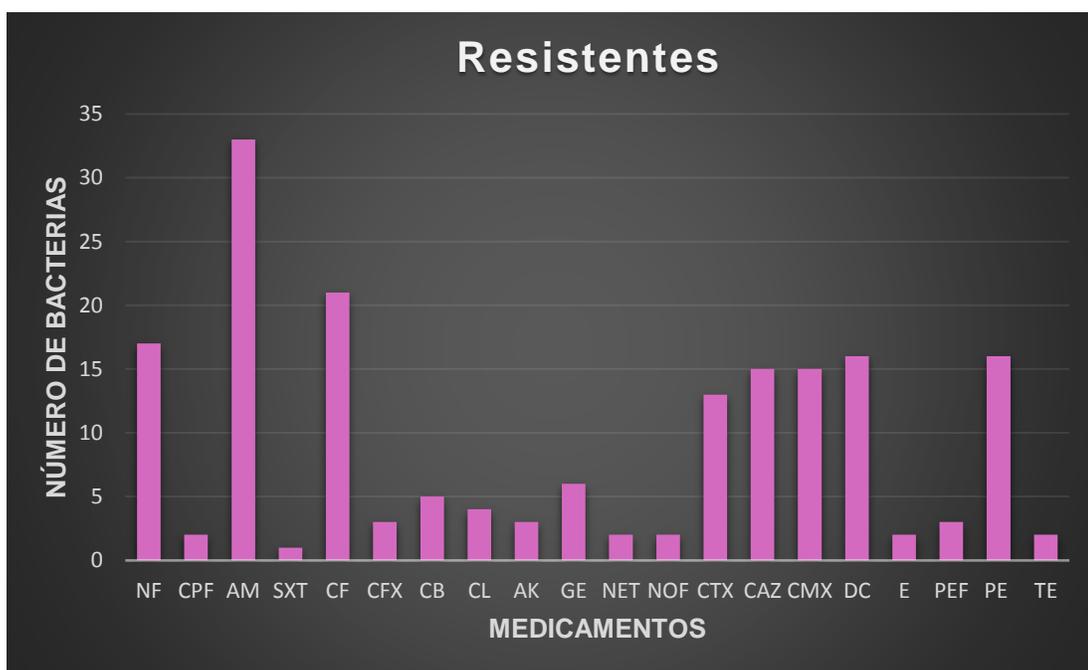
Las gráficas (4 a 6), muestran los resultados de los conteos de los multidiscos de las muestras de la iguana que no come toronja.



Gráfica 4. Número de bacterias con rangos sensibles a los medicamentos. Muestra el número de cepas bacterianas que mostraron sensibilidad a los medicamentos.



Gráfica 5. Número de bacterias con rangos intermedios a los medicamentos. Muestra el número de cepas bacterianas que se encuentran en un rango intermedio con los medicamentos.



Gráfica 6. Número de bacterias con rangos resistentes a los medicamentos. Muestra el número de cepas bacterianas que presentaron resistencia a los medicamentos.

11. DISCUSIÓN

Para la obtención de aceite esencial de *Citrus paradisi* (toronja), en la primera extracción se utilizaron 4 kg de toronja fresca, obteniendo 2 ml de aceite esencial, mientras que en la segunda fueron 7.4 kg de toronja, adquiriendo 3.35 ml de aceite, en ambas extracciones el aceite se adquirió de todo el fruto (cáscara, gajos y semillas) para analizar si se encontraba un mayor número de compuestos, que a diferencia de otros autores como Soto y colaboradores en el 2013 (16) solo ocuparon la cascara del fruto fresco, se resalta que no hubo mucha diferencia de los compuestos encontrados. Dentro de la composición química de *Citrus paradisi* (toronja) obtenida en las dos cromatografías (tablas 3 y 4), el componente más abundante fue el limoneno con un 75.14% en la primera extracción y 69.92% en la segunda. Soto y colaboradores en el 2013 (16), obtuvieron un 70.04% de limoneno y Okunowo (22) reportó un 75.05% de limoneno en el 2013, estos resultados fueron similares a lo obtenido en la primera extracción.

El limoneno (monoterpeno) no solo es el mayor componente de *Citrus paradisi*, sino que también varios estudios reportan que es el que presenta la actividad antimicrobiana pero no lo habían comprobado hasta el 2014 por Payán (26), quien evaluó un efecto antimicrobiano con diferentes compuestos incluyendo al D-limoneno, mezclándolos con nisina, la cual es una bacteriocina, en el estudio, concluyeron que los resultados son más significativos cuando se combina el D-limoneno y la nisina, ya que el D-limoneno actúa sobre la membrana citoplasmática del organismo, mientras la nisina afecta las células mediante la formación de poros en la membrana, reduciendo el potencial transmembrana y el gradiente de pH, lo que resulta la fuga de materiales celulares.

También se encontraron en las cromatografías realizadas otros compuestos como α y β -pineno (terpeno), cariofileno y α -carifileno (sesquiterpenos), β -mirceno, copaeno, ciclohexano, heptano y ciclopentano (hidrocarburos), octanal y decanal (aldehído), eicosano (alcano) y ácidos como el Cia-13- Ácido octadecenoico.

En las plantas, los terpenos son importantes para la defensa contra depredadores, como insectos o patógenos como hongos o bacterias. Además del limoneno el α -pineno está reportado como antibacteriano frente a cepas de *S. aureus*, en un estudio reportado por Cruz en 2014 (27), quien aplicó α -pineno y limoneno puros a una concentración de 0.5% y 1.5%, frente a dos cepas de *Staphylococcus* (sensibles a antibióticos y resistentes a antibióticos) obteniendo inhibición de ambos compuestos, pero α -pineno mostró una mayor inhibición frente a las dos diferentes cepas, para la prueba utilizó lector de microplacas TECAN. Se atribuye la actividad antibacteriana por diversos efectos como cambio en la morfología, inhibición de la respiración celular y ruptura celular. Se ha demostrado que la mayor parte de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales proviene de los terpenos oxigenados (terpenos fenólicos y alcoholes), siendo α -pineno y D-limoneno parte de estos (27).

En cuanto a la morfología colonial, podemos resaltar que las colonias tienen características parecidas entre las primeras muestras y las segundas, en cuanto al tamaño se obtuvieron variaciones, pues las muestras de la iguana que no consume toronja fueron más grandes. Se eligieron 9 medios de cultivo diferentes (agar verde brillante, agar sangre, agar nutritivo, agar sabouraud, agar sulfito bismuto, agar macconkey, agar TCBS, agar S-110, y agar cetrimida) entre ellos de tipo enriquecido y selectivo, para poder obtener una gran variedad de cepas bacterianas, principalmente Gram negativas (entero bacterias).

El crecimiento de las bacterias en estos medios de cultivo nos pueden ayudar a saber el tipo de bacteria que creció, por ejemplo en el agar verde brillante las colonias bacterianas de *Escherichia coli* y *Klebsiella* muestran colores amarillos verdosos (28) o en el caso del agar sulfito bismuto, las colonias que mayormente crecen son las de *Salmonella* con coloraciones marrones o negras muy oscuras (29). En el medio TCBS se obtienen coloraciones amarillos verdosos o amarillos muy brillantes, color característico de *Vibrio cholerae* (30). En las muestras bacterianas que se obtuvieron de las iguanas que consumen y de la iguana que no consume toronja, pudimos observar estas coloraciones ya mencionadas en los medios de cultivo, con lo anterior podemos sospechar que se encontraron este tipo de bacterias Gram negativas durante el proyecto.

En ambas muestras (iguana que consume y que no consume toronja) se observaron diversos cocos positivos como estafilococos (figura 2 B) y algunos diplococos o estreptococos (figura 3 B). Lo anterior se atribuye a la forma en la que están agrupadas las colonias (racimo de uvas, en pares o en cadenas definidas).

De las muestras bacterianas de las iguanas que consumen toronja sometidas a prueba de sensibilidad, se resalta que a pesar de encontrar halos en 2 diferentes bacterias aisladas (bacilos y cocos positivos) con el aceite esencial de *Citrus paradisi*, su efecto no es significativo, ya que de 42 bacterias solo 2 tuvieron halos pequeños.

Probablemente las muestras no fueron sensibles al aceite esencial, porque las iguanas se alimentan de toronja y puede que las bacterias estén acostumbradas y hayan adquirido resistencia a ella, pues se sabe que la flora bacteriana de los reptiles puede variar dependiendo de las condiciones, la edad y la alimentación a nivel cautiverio como lo indica Aldana en el 2002 (21). Es por esto que se decidió hacer pruebas con muestra de la iguana que no consume toronja, comprobando que la actividad antimicrobiana, si estaba dependiendo del tipo de dieta que tuvieran las iguanas, ya que dentro de los resultados que se obtuvieron con las muestras de la iguana que no consume toronja, se resalta que de 44 bacterias sometidas a prueba, 19 (12 Gram negativas y 7 Gram positivas) presentaron halos de 7 a 20 mm.

Según la escala de Duraffourd y colaboradores en 1983 (25) citado por Endara en el 2017, (15) los resultados de las muestras bacterianas se encuentran en un rango de intermedio a sensible al aceite esencial de *Citrus paradisi*, lo cual muestra un resultado favorable, pero aún no es significativo si lo comparamos con estudios que se han realizado en bacterias de humanos, pero si podemos resaltar que es un avance positivo en cuanto a pruebas antibacterianas en reptiles a nivel cautiverio.

En cuanto a los controles, el aceite de olivo no tiene efecto y de los resultados con los antibiogramas podemos destacar que aún hay un amplio rango de medicamentos útiles para combatir bacterias, sin embargo los de uso frecuente como la ampicilina, penicilina, dicloxacilina y cefuroxima no presentaron un efecto en las bacterias, lo que indica que ya no son adecuados para tratar diversas infecciones bacterianas, ya que estas han creado una fuerte resistencia. También se resalta que hubo más medicamentos con rangos resistentes en las muestras bacterianas de la iguana que no consume toronja, mismas que tuvieron mayor efecto con el aceite esencial de *Citrus paradisi L.* (toronja).

Por lo tanto, podemos decir que también se presentaron diferencias en los análisis con los antibiogramas, lo que probablemente nos muestra que si hay un cambio de acuerdo al tipo de dieta de las iguanas, como se vio con las pruebas del aceite esencial de toronja.

12. CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Citrus paradisi* (toronja) tiene efecto antibacteriano frente a las muestras bacterianas de la iguana que no come toronja.
- El componente más abundante del aceite esencial de *Citrus paradisi* (toronja) es el D-limoneno.
- Las bacterias de las dos muestras de iguana (las que consumen y la que no consume) fueron diversas, pero con variaciones morfológicas.
- Al cultivar las muestras bacterianas en diferentes agares, se obtuvo una mayor variación de cepas bacterianas, debido a las características nutritivas y selectivas de cada medio.
- Las técnicas utilizadas para las pruebas de sensibilidad tanto para el aceite esencial como para los controles (antibióticos y aceite de oliva), se realizaron correctamente, encontrando resultados positivos en bacterias Gram positivas y negativas.
- La mayoría de las muestras bacterianas de las iguanas que consumen toronja, fueron sensibles a los antibióticos utilizados, mientras que las muestras de la iguana que no consumió toronja, se obtuvo mayor variedad en los diferentes rangos (sensibles, intermedios y resistentes).

13. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios con el aceite esencial de *Citrus paradisi* (toronja) frente a muestras bacterianas de iguanas silvestres, para comprobar si el efecto es el mismo o ver si existe alguna variación.
- Comparar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus paradisi* (toronja) con ejemplares de iguanas adultos de vida libre y a nivel cautiverio.
- Plasmar un estudio antibacteriano con el aceite esencial de *Citrus paradisi* (toronja) frente a muestras bacterianas de diferentes especies de iguanas a nivel cautiverio.
- Ampliar el estudio antibacteriano del aceite esencial de *Citrus paradisi* (toronja) en muestras bacterianas de iguanas en cautiverio, controlando diferentes parámetros (temperatura, humedad y dieta) en 2 diferentes grupos de iguanas y aumentando el número de cepas bacterianas.
- Aislar el compuesto D-limoneno para analizarlo directamente en las muestras bacterianas de iguanas tanto a nivel cautiverio como de vida libre y así poder comprobar si es el que posee un efecto antibacteriano.
- Identificar las bacterias aisladas, sobre todo las que crecen en medios diagnósticos para *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* ya que pueden ser zoonóticas, para hacer un mejor análisis y saber a qué tipo de bacteria es a la que más afecta y como es que lo hace.
- Demostrar si el efecto inhibitorio del aceite esencial de *Citrus paradisi* (toronja) es el mismo en iguanas a nivel cautiverio, realizando un estudio *in vivo*, enfocándose no solo en la inhibición, sino también en las concentraciones adecuadas para que el aceite no llegue a causar alguna reacción tóxica.

14. ANEXO: TÉCNICAS UTILIZADAS

14.1 Extracción de Aceites Esenciales

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son:

-Por expresión

El material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de la esencia de cítricos (18).

-Hidrodestilación por arrastre de vapor

Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (18).

Se coloca en trozos pequeños la muestra con agua y posteriormente produce vapor en una especie de tanque que alcanza su máxima ebullición y que se inyecta al destilador por donde pasa a través del material botánico. Aquí se observa la separación de dos sustancias, el agua y el aceite esencial, cuando las presiones del vapor combinadas alcanzan la presión del recinto la mezcla comienza a hervir alcanzado hasta unos 300°C de ebullición. El vapor arrastra D-Limoneno, a pesar de que este tenga un punto de ebullición más alto que el agua (352°F) (15).

-Extracción con solventes volátiles

La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia, pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles (18).

En la figura 12 se muestra el equipo ya armado, que se utilizó para la extracción del aceite esencial de toronja en el laboratorio de farmacognosia de la FES-Iztacala.



Figura 10. Proceso de extracción del aceite de toronja. Método arrastre de vapor.

14.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas

La Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas son dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles, constituyen una herramienta potente para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas.

En la cromatografía de gases, la muestra se inyecta en la fase móvil, la cual es un gas inerte (generalmente He). En esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna.

La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación: los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. Un factor clave en este equilibrio es la presión de vapor de los compuestos (en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de los detectores seleccionados (31).

La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas analíticas más completas que existen. Recientemente, esta técnica se utiliza no sólo en investigación, sino también en análisis de rutina de los procesos industriales, en control de calidad, etc. Sus principales cualidades son:

- Capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.
- Cuantitativa: permite medir la concentración de las sustancias.
- Gran sensibilidad: habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb y en casos específicos se puede llegar hasta ppt e incluso ppq.
- Universal y específica.
- Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.
- Suministra información isotópica.

-Es una técnica rápida: se puede realizar un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases (31).

Una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas. En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o "TIC" (total ion current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado (31).

En la figura 11 y 12, se muestran las gráficas de las cromatografías y espectrofotometrías que se realizaron después de la extracción del aceite esencial de *Citrus paradisi* L. (toronja). En ambas extracciones el pico más alto (6.022, 5.990 y 6.062) fue el compuesto limoneno, siendo el más abundante.

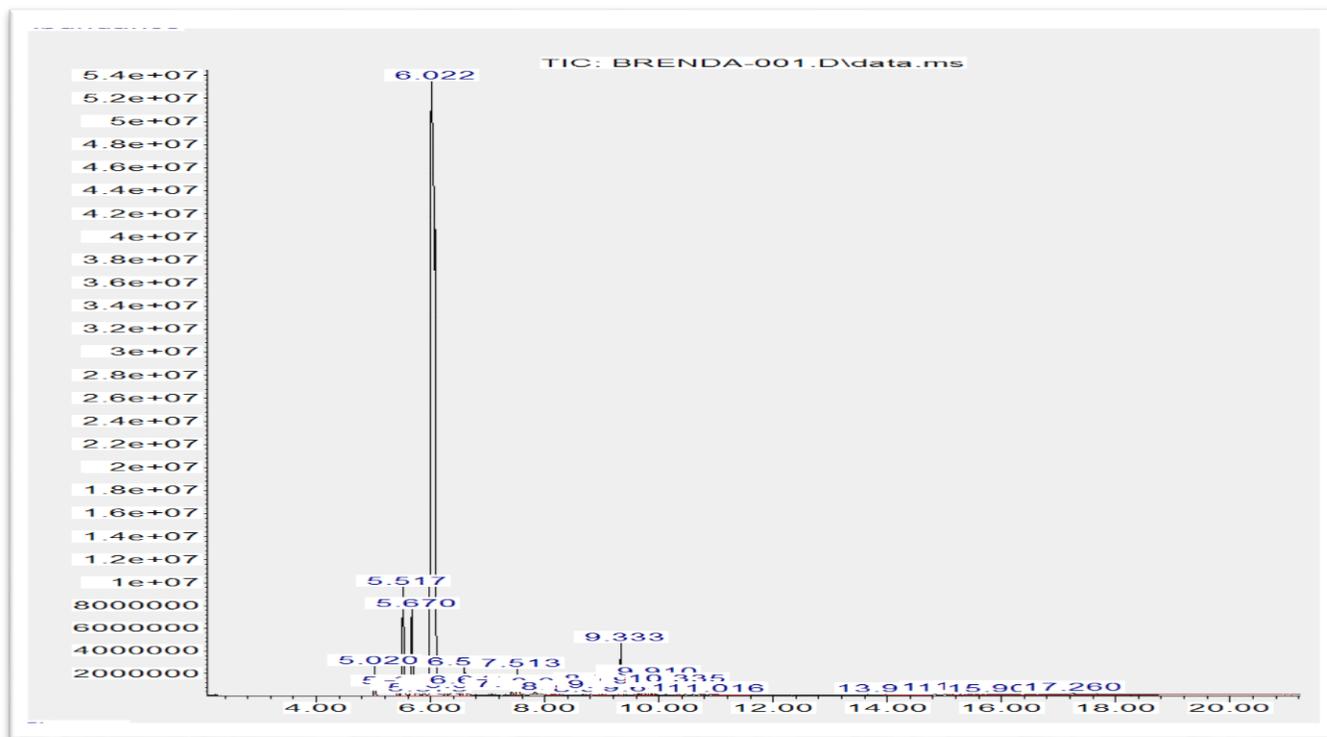


Figura 11. Gráfica de la primer cromatografía del aceite esencial de *Citrus paradisi* que muestra los compuestos obtenidos.

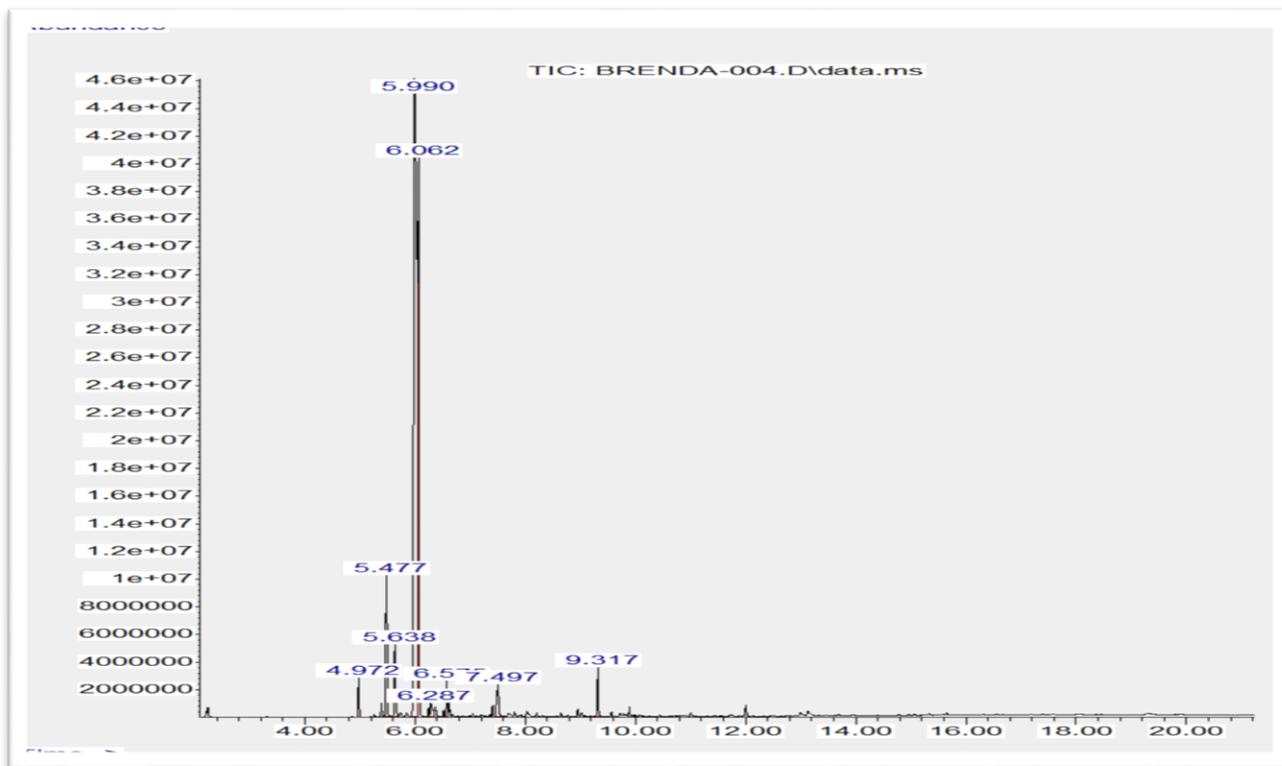


Figura 12. Gráfica de la segunda cromatografía del aceite esencial de *Citrus paradisi* que muestra los compuestos obtenidos en la extracción.

14.3 Morfología colonial

La morfología nos da una información primaria sobre el tipo de bacteria, no de forma concluyente pero sí como paso previo a cualquier proceso de identificación y clasificación taxonómica, así como poder trabajar con cada colonia de forma más eficiente.

Entre las principales características macroscópicas de las bacterias se encuentran su tamaño, forma, superficie, elevación, borde y color. Todas estas características van a constituir la morfología propia de las células bacterianas (32).

-Tamaño: El tamaño de las bacterias va a variar desde las llamadas puntiformes (de .5 mm de diámetro o inferiores), las medianas de 1 a 3 mm y las de 4 a 8 mm las grandes o las que llegan a extenderse por todo el medio de cultivo.

-Forma: Se encuentran formas diversas como las puntiformes, circulares, ovaladas, filamentosas, irregulares, regulares, rizoides y las fusiformes.

-Superficie: Corresponde al aspecto de la colonia, pueden ser lisas, rugosas, plana, acuminada, planoconvexas, umbilicada o convexa.

-Elevación: Tiene que ver con la superficie si es plana, elevada, convexa, montañosa o cratiforme.

-Borde: El borde de la colonia puede verse redondeado, ondulado, lobulado, espiculado, filamentosos o rizoide.

-Color: Hay una gran variedad de colores y tonalidades desde las colonias transparentes, blancas, color carne, rosas, amarillas, verdes, cafés. Pueden tener aspecto lechoso, opaco, brillante o translucidas. (32)

14.4 Tinción de Gram

La tinción de Gram es una prueba rápida que permite distinguir entre las dos clases fundamentales de bacterias (Gram positivas y Gram negativas).

Para realizarla, se pone una pequeña cantidad de bacteria fresca en un portaobjetos limpio con ayuda de una asa previamente esterilizada, se deja secar y se fija la muestra con calor. Una vez fija, se coloca el primer colorante (cristal violeta) sobre la muestra de bacteria y se deja actuando durante 30 a 60 segundos, se enjuaga con agua destilada sin exceder, después se pone yodo lugol y se deja actuar durante 60 segundos y se vuelve a enjuagar, posteriormente se pone alcohol o acetona y se enjuaga inmediatamente con agua destilada, por último se aplica el último colorante (safranina) dejándolo por lo menos 45 segundos y volvemos a enjuagar.

Al tratar las bacterias teñidas con alcohol durante la tinción, las bacterias Gram positivas no se decoloran porque su pared de peptidoglicano es gruesa, contiene pocos lípidos y dificulta la penetración del alcohol que pudiera extraer el colorante. Por el contrario las Gram negativas tienen una pared de peptidoglicano más delgada, recubierta por una envoltura de composición fundamentalmente lipídica. Debido a esto el alcohol, al disolver los lípidos, incrementa la porosidad de la pared celular y arrastra el colorante del interior de la célula teñida, por lo que la bacteria se decolora, quedando teñida con la safranina (13).

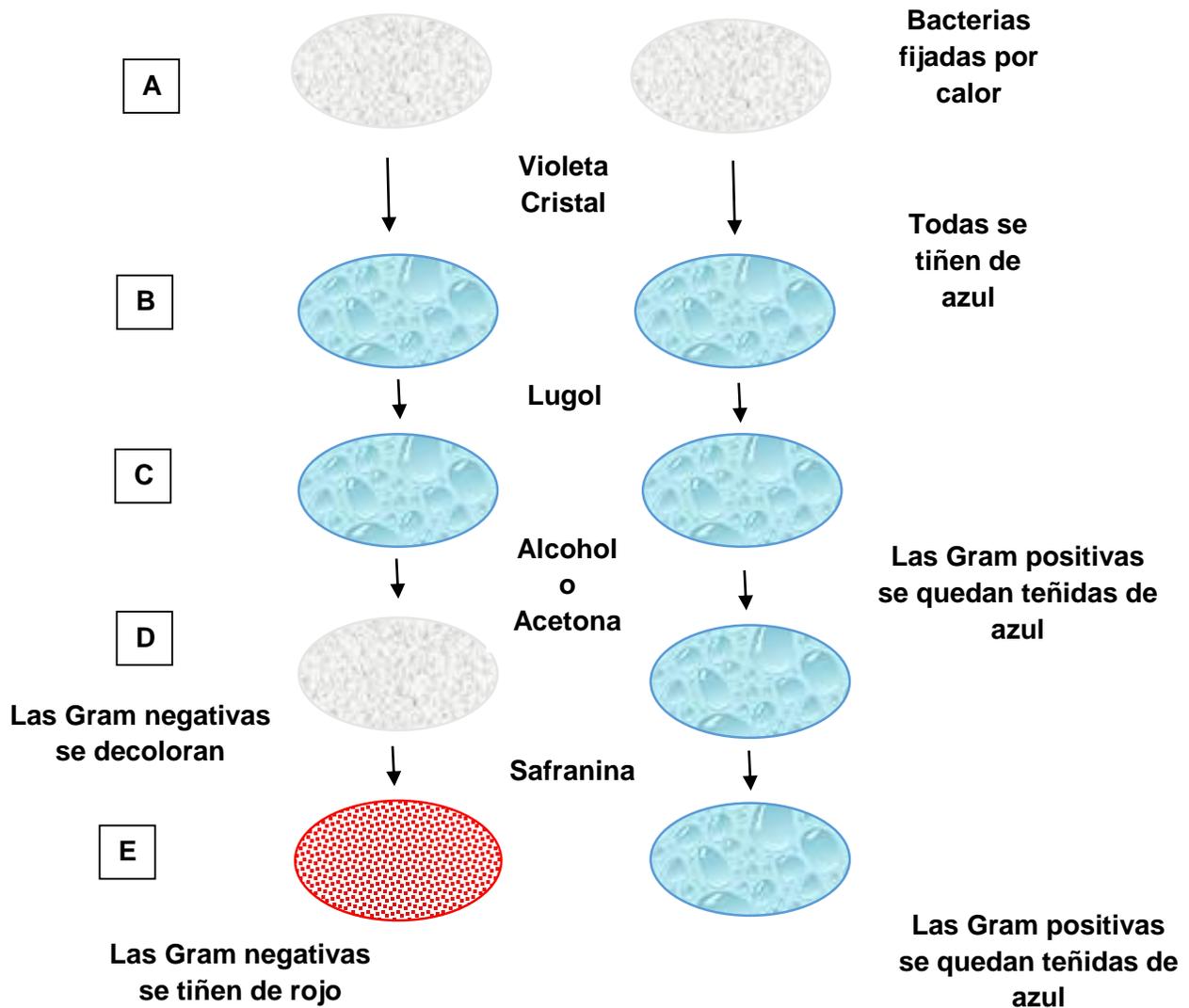


Figura 13. Pasos para realizar la Tinción de Gram. Fuente Macarulla y Goñi, 1994 (13).

14.5 Kirby- Baüer

Es una prueba de sensibilidad que se puede realizar con técnicas de antibiograma ya estandarizados o con la prueba en discos.

Para los discos de antibiograma, son producidos por casas comerciales bajo un riguroso protocolo de control internacional, se utilizan discos para bacterias de tipo Gram positivas y otro para Gram negativas. Cada disco contiene una concentración predeterminada que permite una correlación más o menos precisa con la concentración mínima inhibitoria que dicho antibiótico alcanza "in vivo" según los resultados de resistencia o susceptibilidad. Los recipientes individuales que contienen los discos deben mantenerse refrigerados de 4-5°C o almacenados a menos 20°C hasta que sean utilizados (33).

Para los discos, generalmente son hechos con papel filtro, antes de usar también se mide su capacidad de absorción para saber la cantidad que podemos agregar de cada medicamento o compuesto a estudiar. Los discos son previamente esterilizados antes de que sean ocupados en las pruebas.

Para realizar esta prueba primero se prepara el medio de cultivo, habitualmente se ocupa Agar Müller-Hinton o Agar Neomicina, el agar se vierte en cajas Petri y se dejan 24 hrs en la incubadora, después se llevan a refrigeración de 4 a 8 °C hasta su uso.

Después de esto, con un aplicador (hisopo estéril) se toma una muy pequeña cantidad de la bacteria y se siembra en la caja Petri de manera uniforme en todas direcciones. Después con ayuda de unas pinzas estériles, se colocan los antibiogramas o discos con los medicamentos a utilizar, presionándolos ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto uniforme.

Colocar los discos con un espacio uniforme entre ellos, para evitar que las zonas de inhibición queden imbricadas. Después de esto se meten a incubar de 35 a 37°C por 24 hrs.

Por ultimo las cajas se sacan de la incubadora y se miden los halos de inhibición, para esto se utiliza compases de calibración, vernier, regla o con plantillas ya diseñadas para este propósito, después de medir, viene la interpretación de los resultados, donde las cepas serán clasificadas como resistentes, intermedias o sensibles dependiendo del diámetro de inhibición (33).

15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vidal de los Santos E. Taller de Profesionalización de la Biología. Universidad Nacional Autónoma de México (FESI). México; 2013. 89 p.
2. Flores- Villela O, García-Vázquez U.O. Biodiversidad de Reptiles en México. Rev Mex Biodivers. [Internet]. 2014 [citado en febrero 2018]; 85. Recuperado a partir de: <http://revista.ib.unam.mx/index.php/bio/article/view/1082/979>
3. Aguilar MS, Comparación entre las enfermedades presentadas por los reptiles en tres áreas del vivario de la FES Iztacala UNAM. Tesis de Licenciatura. [Internet] [México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015 [citado en febrero 2018]. Recuperado a partir de: <https://es.scribd.com/document/369913989/Enfermedades-en-reptiles>
4. Meneghel M. Biología Animal. Reptilia. [Curso Práctico]. 2006. [citado en febrero del 2018]. Recuperado a partir de: <http://zvert.fcien.edu.uy/reptiles.pdf>
5. Altamirano AT, Soriano MS. *Anfibios y Reptiles (especies de Alvarado Veracruz, México)*. Universidad Nacional Autónoma de México (FESI). México; 2010. 99 p.
6. Barragán F, Karol B. Enfermedades de Reptiles y Anfibios. Boletín GEAS. [Internet]. 2002. [citado en marzo del 2018]; 3 (1-6): 18-27. Recuperado a partir de: <http://tumascota.zz.mu/wp-content/uploads/2013/12/Enfermedades-reptiles-y-anfibios.pdf>
7. Martínez SM, Arcos GL, Vélez HL, Mendoza MG, López PR. La iguana verde (*Iguana iguana*) y sus parásitos en una unidad de manejo intensivo en la costa de Oaxaca. [Ensayos]. 2015. [citado en febrero del 2018]. Recuperado a partir de: http://www.utm.mx/edi_anteriores/temas55/T55_1E5_IguanaVerde.pdf
8. Solórzano Aburto EL, Canales Valle SM. Estudio de las estructuras anatómicas de le especie iguana verde (**Iguana iguana**) en Nicaragua. Tesis de Licenciatura. [Internet] [Managua, Nicaragua]: Universidad Nacional Agraria. Facultad de Ciencias Animal; 2009. [Citado en febrero del 2018]. Recuperado a partir de: <http://repositorio.una.edu.ni/1413/1/tnl40s689.pdf>
9. González A, Ríos V. Guía para el manejo y cría de la iguana verde *Iguana iguana* Linneo. [Internet]. Colombia: ANCON; 2003 [citado en marzo del 2018]. Recuperado en: <https://books.google.com.mx/books?id=74G3oECUo4YC&pg=PT10&dq=iguana+verde&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiA64XYpqjUAhUEOyYKHf5qAywQ6AEIKjAC#v=onepage&q=iguana%20verde&f=false>

10. Rubio MB. Manejo en cautiverio de anfibios y reptiles. Guía para el voluntariado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM. Estado de México; 1998. 24 p.

11. Yarto JE, Alojamiento y Problemas relacionados en reptiles: quemaduras, problemas digestivos y respiratorios. [Cuarto Congreso]. 2011. [citado en abril del 2018]. Recuperado a partir de: <https://es.slideshare.net/iltaitDes/alojamiento-y-problemas-relacionados-en-reptiles>

12. Cortés D. Diccionario Oxford, Medicina. [Internet]. Madrid: Complutense; 2001 [citado en marzo del 2018]. Recuperado en:

https://books.google.com.mx/books?id=K_egr6TJasYC&pg=PA82&dq=que+es+un+a+bacteria&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi6nN-I_MzZAhUREawKHSiuBW0Q6AEILDAB#v=onepage&q=que%20es%20una%20bacteria&f=false

13. Macarulla JM, Goñi FM. Bioquímica Humana, curso básico. [Internet]. Barcelona: REVERTÉ; 1994 [citado en abril del 2018]. Recuperado en:

https://books.google.com.mx/books?id=4h_losytGvkC&pg=PA161&dq=bacterias+gram+positivas+y+gram+negativas&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiAhZWduejZAhVoqVQKHXPNAJcQ6AEIJzAA#v=onepage&q=bacterias%20gram%20positivas%20y%20gram%20negativas&f=false

14. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica. [Internet]. Barcelona, España: Elsevier; 2016 [citado en abril el 2018]. Recuperado en:

<https://books.google.com.mx/books?id=GOaVDgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=microbiologia+edicion+2017&hl=es-%20419&sa=X&ved=0ahUKEwjRiKmSxf7ZAhVBwlQKHZHDBAUQ6AEIJzAA#v=onepage&q&f=false>

15. Endara Córdova JI. Efecto inhibitorio del aceite esencial de "*Citrus paradisi*" a diferentes concentraciones y tiempos sobre *Porphyromona gingivalis*. Estudio in vitro. Tesis de Licenciatura. [Internet] [Ecuador]: Universidad Central del Ecuador. Facultad de Odontología; 2017. [Citado en marzo del 2018]. Recuperado a partir de:

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/13302/1/T-UCE-0015-813.pdf>

16. Soto L, Ogeda de Rodriguez G, Rojas L, Sulbarán B, Peña J, Berradre M, Fernández V. Caracterización química del aceite esencial de toronja (*Citrus paradise* L.). Rev. Fac. Agron. (LUZ). [Internet]. 2013, [citado en marzo del 2018]; 30:266-283. Recuperado a partir de:

http://revfacagronluz.org.ve/PDF/abril_junio2013/v30n2a2013266283.pdf

17. Rosas-Gallo A, López Malo A. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de tomillo. UDLAP. [Internet]. 2011, [citado en marzo del 2018]; (5-1): 41-50. Recuperado a partir de: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5\(1\)-Rosas-Gallo-et-al-2011.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5(1)-Rosas-Gallo-et-al-2011.pdf)
18. Martínez MA. Aceites Esenciales. [Internet]. 2003. [citado en marzo del 2018]. Recuperado a partir de: http://www.medinformatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf
19. Gómez UM, Escalera DA, Martínez AA, Paredes DL, Conde CY. Propiedades medicinales del Pomelo, beneficios nutricionales y su aplicación en la estética. Scielo. [Internet]. 2015, [citado en marzo del 2018]; 10(24): 49-52. Recuperado a partir de: http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/riis/v10n24/v10n24_a08.pdf
20. Uysal, B., F. Sozme, O. Aktas, O. Oksal, E, Kose. *Essential oil composition and antibacterial activity of the grapefruit (Citrus Paradisi. L) peel essential oils obtained by solvent-free microwave extraction: comparison with hydrodistillation*. International Journal of Food Science and Technology. [Internet]. 2011, [citado en enero del 2018]; 46(1). Recuperado a partir de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2621.2011.02640.x>
21. Aldana González LA, *Aislamiento e identificación de bacterias asociadas a procesos patológicos de anfibios y reptiles del laboratorio de Herpetología- Vivario de la UNAM campus Iztacala*. Tesis de Licenciatura. [Internet] [México]: Los reyes Iztacala; 2002. [Citado en enero del 2018]. Recuperado a partir de: <http://132.248.9.195/ptd2014/anteriores/microformas/0315363/Index.html>
22. Okunowo WO, Oyedeji O, Afolabi OL, Matanmi E. Essential Oil of Grape Fruit (*Citrus paradisi*) Peels and Its Antimicrobial Activities. AJPS. [Internet]. 2013. [citado en marzo del 2018]; 4(1-9): 2-10. Recuperado a partir de: http://file.scirp.org/pdf/AJPS_2013071515462893.pdf
23. Domingo D, López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev. Esp. Quimioter. [Internet]. 2003. [citado en abril del 2018]; 16 (4) 385-393. Recuperado a partir de: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>
24. Prieto A, Auro de Campo A, Fernández A, Pérez BM. El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. TIP. [Internet]. 2005. [citada en marzo del 2018]; 8(1):38-49. Recuperado a partir de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revespciequibio/cqb-2005/cqb051e.pdf>
25. Duraffourd C, D' hervicourt L, La praz JC. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1º edición. Editorial Masson SA. París; 1983. [Libro no disponible en internet]

26. Payan Saldívar LE, Evaluación del efecto combinado de los antimicrobianos naturales nisina, D-limoneno, glucósido desteviol y citral sobre *Listeria monocytogenes* en alimentos de origen vegetal. Tesis. [Internet] [Cartagena]: Universidad Politécnica de Cartagena; 2014. [Citado en febrero del 2018]. Recuperado a partir de:

<http://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/4662/tfm489.pdf?sequence=1>

27. Cruz Villeda, D.E. Evaluación de los aceites esenciales (alfa pineno y limoneno) contra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* productores de enterotoxinas in vitro. Tesis. [Internet] [Honduras]: Carrera agroindustria alimentaria; 2014. [Citado en Marzo del 2019]. Recuperado a partir de:

<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/3346/1/AGI-2014-T008.pdf>

28. Instrucciones de uso-Medio en placas, listo para su uso. BD (Brillant Green Agar). [Internet]. 2013. [Citado en Marzo del 2019]. Recuperado a partir de:

<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8755>

29. Instrucciones de uso. Pronadisa, micro and molecular biology (Agar sulfito bismuto). [Internet]. 2010. [Citado en Marzo del 2019]. Recuperado a partir de:

https://www.condalab.com/uploads/media/1011_AGAR_BISMUTO_SULFITO_RE_v_0_Abril_2010_01.pdf

30. Instrucciones de uso-Medio en placas, listo para su uso. BD (TCBS Agar). [Internet]. 2003. [Citado en Marzo del 2019]. Recuperado a partir de:

<https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-254432.pdf>

31. Gutiérrez M.C., Droguet M. Identificación de compuestos volátiles por CG-MS. Boletín Intexter (U.P.C.) [Internet]. 2002. [citado en Marzo del 2018]. (122) 35-4. Recuperado a partir de:

<https://docplayer.es/6721822-La-cromatografia-de-gases-y-la-espectrometria-de-masas-identificacion-de-compuestos-causantes-de-mal-olor.html>

32. López T.L., Torres C. El tamaño, forma y tipos de agrupaciones bacterianas. Universidad Nacional del Noreste, Facultad de agroindustrias. [Internet]. 2006. [citado en Marzo del 2019].1-12 Recuperado a partir de:

<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp6.pdf>

33. Bernal M.R., Guzmán U. M. El antibiograma de discos. Normalización de la técnica Kirby-Bauer. Biomédica de Bogotá. [Internet]. 1984. [citado en Marzo del 2019]. 4 (3 y 4)112-121. Recuperado a partir de:

<https://es.scribd.com/document/357179708/Antibiograma-de-Disco-Normalizacion-Kirby-bauer>