

**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA  
CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**“PROCESO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTO A PARTIR DE LA SEMILLA DE LA  
TORONJA (CITRUS PARADIS), Y SU APLICACIÓN EN DESINFECCIÓN DE  
VEGETALES O FRUTAS Y SUPERFICIES PLANAS.”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PRESENTADO**

**PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO QUÍMICO**

**ELABORADA POR:**

**WAGNER GANEN MACÍAS SORNOZA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Ing. JOSÉ RODRÍGUEZ WESTER**

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**AÑO: 2014**

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar darle gracias a Dios por darme la vida, por la fuerza de voluntad y por la sabiduría que me ha brindado para salir adelante y permitirme culminar una meta más en mi vida.

A mi madre que gracias a su esfuerzo, consejos, motivación y amor ha sabido guiarme por el buen camino de la vida, brindándome todo su apoyo incondicional hasta llegar ser yo la persona que soy ahora.

A mi esposa e hijos que fueron mi motivo de inspiración para superarme y salir adelante y no dejarme dar por vencido en este nuevo alcance de mi vida.

A mis hermanos y amigos que con sus aportaciones y comentarios me han apoyaron para salir adelante, en especial a mi amigo Cristian Almeida.

A las Dras. Betty Ordoñez y Mónica Wong por todos sus conocimientos y ayuda brindada que fueron la parte esencial para que yo pueda culminar con este proyecto.

A la Dra. Julieta Chediak que me brindó sus conocimientos para incluirlo en este trabajo, y al Dr. Luis Zalamea por su ayuda brindada al prestarme los equipos, materiales e instalaciones usadas en mi trabajo de titulación.

A mi Director de trabajo de titulación, al Ing. José Rodríguez por haber puesto su confianza en mí, por toda su paciencia y conocimientos impartidos en todo momento de la realización de este proyecto, mi más sincero agradecimiento.

A todos muchas gracias.

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente trabajo de investigación a mi madre que siempre me brindó su apoyo incondicional en todo momento de mi vida, a mis hermanos que con su granito de arena fueron el precursor para cumplir mis metas, a mi esposa que siempre estuvo a mi lado en los momentos más difíciles y a mis dos hijos que llegaron a darme alegrías y a complementar mi vida.

Los amo mucho,

Wagner.

## **DECLARACIÓN DE AUTORIA**

Declaro que este trabajo y su contenido me corresponden exclusivamente y que se han citado las fuentes correspondientes, respetando las disposiciones legales que protegen los derechos de autores vigentes.

---

Wagner Ganen Macías Sornoza

CI.0922961354

## RESUMEN

Para contra restar la presencia de bacterias y gran parte de hongos como los mohos y levaduras presentes en los alimentos que producen enfermedades gastrointestinales como salmonelosis, cólera, amebiasis, shigelosis y disentería y otras enfermedades que afectan el aparato digestivo; mediante el presente trabajo se obtiene un extracto a partir del desecho de una fruta que es la semilla de la toronja, que será usado como desinfectante orgánico para frutas y vegetales.

La semilla obtenida de la fruta de la toronja del árbol del pomelo, es rica en flavonoides predominando la naringina, estos elementos fitoquímicos son eficaces para combatir 800 tipos de bacterias y un gran número de parásitos nocivos para la salud humana.

Se obtiene el extracto de la semilla de la toronja por una extracción lenta y prolongada que consiste en la maceración de la semilla previamente secada y molida, a 25°C de temperatura usando como solvente el etanol, el producto obtenido de la maceración es filtrado y concentrado para separar el extracto de la semilla de la toronja del solvente.

El extracto de la semilla de toronja fue analizada microbiológicamente a diferentes concentraciones para determinar su efectividad como un desinfectante bactericida y aplicarlo en el uso de desinfección de frutas y vegetales dando como resultado un valor de cero en UFC/ml, tanto en bacterias aerobios mesófilos como en moho y levaduras.

El extracto de la semilla de toronja fue aplicada en los alimentos mas tradicionales en la cual no se acostumbra a pelar para consumirla, como son las uvas, frutillas y tomates; se les hizo un análisis microbiológico de un antes y después de lavarlos con agua potable y luego desinfectados con el extracto de la semilla de la toronja diluido en agua declorada, teniendo resultados muy comparativos desde una carga microbiana incontables a una carga reducida en aerobios mesofilos de 250, 1400 y 100 UFC/cm<sup>2</sup> en uvas, frutillas y tomates respectivamente; en moho y levadura de 0, 145 y 130 UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente.

## ABSTRACT

To subtract against bacteria and fungi much as molds and yeasts in foods that cause gastrointestinal diseases such as salmonella, cholera, amebiasis, shigellosis and dysentery and other diseases that affect the digestive system; This work by an extract from a fruit waste which is the seed of grapefruit, to be used as organic fruits and vegetables sanitizer is obtained.

The seed obtained from the fruit tree grapefruit grapefruit, is predominantly rich in flavonoids naringin, these phytochemicals are effective against bacteria types 800 and a number of parasites harmful to human health.

The seed extract of grapefruit by a slow and prolonged extraction involves steeping the previously dried and ground seed, at 25 of temperature using as solvent ethanol, the product obtained by maceration is filtered and concentrated to obtain separating the extract of grapefruit seed solvent.

The extract of grapefruit seed was analyzed microbiologically at different concentrations to determine their effectiveness as a bactericidal disinfectant and apply the use of disinfecting fruits and vegetables resulting in a zero value in cfu/ml, both mesophilic aerobic bacteria as in mold and yeast.

The extract of grapefruit seed was applied in the most traditional food which is not used to peel to consume, such as grapes, strawberries and tomatoes; were asked a microbiological analysis before and after washing with water and then disinfected with extract of grapefruit seed diluted in dechlorinated water, highly comparative results from a countless microbial load a reduced load of aerobic mesophile 250, 1400 and 100 cfu/cm<sup>2</sup> in grapes, strawberries and tomatoes respectively; in mold and yeast 0, 145 and 130 cfu/cm<sup>2</sup> respectively.

# ÍNDICE

<b>I. CAPITULO 1</b> .....	1
<b>1.1. TEMA</b> .....	1
<b>1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	3
<b>1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA</b> .....	4
<b>1.5. DELIMITACIÓN DEL ESTUDIO</b> .....	4
1.5.1. Delimitación Espacial .....	4
1.5.2. Delimitación Temporal .....	4
<b>1.6. ALCANCE DEL TRABAJO</b> .....	5
1.6.1. Alcance Social .....	5
1.6.2. Alcance Económico.....	5
<b>1.7. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	6
1.7.1. General: .....	6
1.7.2. Específicos:.....	6
<b>1.8. PREGUNTAS A CONTESTAR</b> .....	6
<b>1.9. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA</b> .....	7
<b>1.10. HIPÓTESIS</b> .....	8
1.10.1. Hipótesis General.....	8
1.10.2. Hipótesis específicas.....	8
<b>1.11. VARIABLES</b> .....	9
1.11.1. Variable Dependiente .....	9
1.11.2. Variables independientes .....	9
<b>1.12. OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE</b> .....	10
<b>II. CAPITULO 2</b> .....	11
<b>2.1. ANTECEDENTE INVESTIGATIVO</b> .....	11
<b>2.2. TORONJA</b> .....	11
2.2.1. Generalidades .....	11
2.2.2. Variedades .....	13
2.2.3. Propiedades Nutritivas.....	15
2.2.4. Usos.....	19
<b>2.3. EXTRACCIÓN</b> .....	19

2.3.1.	Métodos de Extracción .....	19
2.3.2.	Métodos de Extracción de principios activos .....	20
2.4.	EXTRACTO DE SEMILLA DE TORONJA .....	25
2.4.1.	Poder Antimicrobiano .....	27
2.5.	ANTIBACTERIAL DEFINICIÓN .....	28
2.5.1.	Antibacterianos comunes .....	29
2.5.2.	Regulación de Antibacteriales .....	30
2.5.3.	Beneficios de los antibacteriales .....	30
2.5.4.	Diferencias entre Antibacterial, Desinfectante y Esterilizadores. ....	31
III.	CAPITULO 3. ....	33
3.1.	Metodología de la Investigación .....	33
3.1.1.	Tipos y Enfoques Metodológicos.....	33
IV.	CAPITULO 4. ....	47
4.1.	Balance de materia.....	47
4.2.	Resultados experimentales.....	49
4.2.1.	Análisis microbiológico del producto .....	49
4.2.1.1.	Método Kirby-Bauer .....	49
4.2.1.2.	Método de recuento estándar en placa .....	50
4.3.	Análisis e interpretación de los resultados .....	54
4.4.	Comparación de datos obtenidos.....	56
	CONCLUSIÓN .....	57
	RECOMENDACIÓN .....	58
	BIBLIOGRAFÍA .....	59
	ANEXOS .....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Valor Nutricional del pomelo	18
<b>Tabla 2.</b> Grupos de Sustancias antibacterianas	29
<b>Tabla 3:</b> Resultados de inhibición microbiana para Bacteria Gran Negativa	49
<b>Tabla 4:</b> Resultados de inhibición microbiana para Bacteria en general	50
<b>Tabla 5:</b> Resultado de los análisis microbianos de aerobios mesófilos del extracto de la semilla de toronja en diferentes concentraciones en agua declorada	50
<b>Tabla 6:</b> Resultado de los análisis microbianos de moho y levadura del extracto de la semilla de toronja en diferentes concentraciones en agua declorada.	51
<b>Tabla 7:</b> Resultado de los análisis microbianos de aerobios mesófilos de las uvas, frutillas y tomates frescos	51
<b>Tabla 8:</b> Resultado de los análisis microbianos de moho y levadura de las uvas, frutillas y tomates frescos	52
<b>Tabla 9:</b> Resultado de los análisis microbianos de aerobios mesófilos de las uvas, frutillas y tomates enjuagados con agua potable.	52
<b>Tabla 10:</b> Resultado de los análisis microbianos de moho y levadura de las uvas, frutillas y tomates enjuagados con agua potable.	53
<b>Tabla 11:</b> Resultado de los análisis microbianos de aerobios mesófilos de las uvas, frutillas y tomates desinfectados con el EST al 10%	53
<b>Tabla 12:</b> Resultado de los análisis microbianos de moho y levadura de las uvas, frutillas y tomates desinfectados con el EST al 10%	54
<b>Tabla 13:</b> Comparación de bacterias presentes en los alimentos de un antes y después de ser lavados y desinfectados con el EST.	56

**Tabla 14:** Comparación de bacterias presentes en los alimentos de un antes y después de ser lavados y desinfectados con el EST. 56

**Tabla 15:** Ensayos realizados con el ESP en determinadas cepas bacterianas tanto Gram negativas como positivas, hongos y levaduras. 61

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura. 1.</b> Partes de la toronja.	12
<b>Figura 2:</b> variedad de toronjas.	13
<b>Figura. 3.</b> Infusión digestiva.	21
<b>Figura. 4.</b> Decocción.	22
<b>Figura. 5.</b> Maceración de Aceites Aromatizados.	23
<b>Figura. 6.</b> Percolación de valeriana pavonii.	25
<b>Figura 7.</b> Semilla de toronja.	26
<b>Figura 8:</b> Rotavapor.	34
<b>Figura 9:</b> Contador de Colonias o Lupa.	34
<b>Figura 10:</b> Diagrama del aprovechamiento integral de la toronja.	41
<b>Figura 11:</b> Diagrama de la elaboración de jugo de toronja.	42
<b>Figura 12:</b> Diagrama de la obtención de pectina a partir de la cáscara de toronja.	43
<b>Figura 13:</b> Diagrama de la obtención del extracto de semilla de toronja.	44

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo 1:</b> Ensayos realizados con el ESP en determinadas cepas bacterianas tanto Gram negativas como positivas, hongos y levaduras.	62
<b>Anexo 2:</b> Fotos del proceso de obtención del extracto de la semilla de toronja.	67
<b>Anexo 3:</b> Fotos de la toma de muestra microbiológico de los alimentos.	69
<b>Anexo 4:</b> Fotos de los análisis microbiológicos de aerobios mesófilos del extracto de la semilla de toronja a concentraciones del 1, 5, 10, 20 y 100 %.	71
<b>Anexo 5:</b> Fotos de los análisis microbiológicos de moho y levaduras del extracto de la semilla de toronja a concentraciones del 1, 5, 10, 20 y 100 %.	72
<b>Anexo 6:</b> Fotos de los análisis microbiológico de aerobios mesófilos de las uvas, frutillas y tomates frescos antes de lavar.	73
<b>Anexo 7:</b> Fotos de los análisis microbiológico de moho y levadura de las uvas, frutillas y tomates frescos antes de lavar.	74
<b>Anexo 8:</b> Fotos de los análisis microbiológico de aerobios mesófilos de las uvas, frutillas y tomates después de ser lavados con agua potable.	75
<b>Anexo 9:</b> Fotos de los análisis microbiológico de moho y levadura de las uvas, frutillas y tomates después de ser lavados con agua potable.	76
<b>Anexo 10:</b> Fotos de los análisis microbiológico de aerobios mesófilos de las uvas, frutillas y tomates desinfectados con el extracto de la semilla de la toronja.	77
<b>Anexo 11:</b> Fotos de los análisis microbiológico de moho y levadura de las uvas, frutillas y tomates desinfectados con el extracto de la semilla de toronja.	78
<b>Anexo 12:</b> Fotos de los análisis de difusión por disco del EST.	79
<b>Anexo 13:</b> Fotos de los análisis microbiológicos del EST por métodos de extracciones no factibles.	81

<b>Anexo 14:</b> Fotos de los análisis comparativo de productos desinfectantes comerciales con el EST	84
<b>Anexo 15:</b> Fotos de los análisis microbiológico de las frutillas desinfectadas con etanol a 98° al 1 y 10% de dilución	85
<b>Anexo 16:</b> Diferentes Tipos de desinfección	87

## NOMENCLATURA

<b>UFC</b>	Unidad formadoras de colonias
<b>UFC/ml</b>	Unidad formadoras de colonias por mililitro
<b>UFC/cm<sup>2</sup></b>	Unidad formadoras de colonias por centímetros cuadrados
<b>ug</b>	Microgramos
<b>A</b>	Número de colonias en la primera caja petri (dilución 1x10 y 1x100)
<b>B</b>	Número de colonias en la segunda caja petri (dilución 1x10 y 1x100).
<b>PDA</b>	Potato de Extrose Agar
<b>PCA</b>	Plate Count Agar
<b>TPC</b>	Recuento Estándar en Placas
<b>EST ó ESP</b>	Extracto de la Semilla de Toronja ó Pomelo
<b>ESTc</b>	Extracto de la Semilla de Toronja concentrado
<b>ESTd</b>	Extracto de la Semilla de Toronja diluido
<b>Sf</b>	Peso de semillas frescas
<b>Ss</b>	Peso de semillas secas
<b>S</b>	Solvente
<b>M</b>	Mezcla
<b>B</b>	Bagazo
<b>Sr</b>	Solvente recuperado

## **I. CAPITULO 1**

### **1.1. TEMA**

PROCESO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTO A PARTIR DE LA SEMILLA DE LA TORONJA (CITRUS PARADIS), Y SU APLICACIÓN EN DESINFECCIÓN DE VEGETALES O FRUTAS Y SUPERFICIES PLANAS.

### **1.2. INTRODUCCIÓN**

El Ecuador es el lugar ideal para los amantes de las frutas. Aquí hay infinidad de variedades de las que usted quizá jamás haya oído hablar, cada una con un sabor indescriptible.

Al momento que la fruta es cosechada, empieza la senescencia, haciéndolo más susceptible al deterioro microbiológico. El deterioro es causado por una proporción pequeña de la microbiota ya presente y de las alteraciones que se someten bajo las condiciones ambientales y de almacenamiento; incluyendo los factores como la contaminación inicial, las propiedades del sustrato y las características de los microorganismo.

Las diferentes clases de microorganismos pueden encontrarse sobre frutas o vegetales, las características propias del producto afectan a los organismos residentes, determinando cuales finalmente se desarrollarán. Los vegetales tienen en general un pH entre 5 y 6 mientras que las frutas tales como las manzanas, mangos, frutillas, duraznos y etc. muestran un valor menor a 4,5 sin embargo existen excepciones. Por lo tanto las bacterias se desarrollan más rápido que los mohos y levaduras sobre la mayoría de los vegetales, y al contrario en el caso de las frutas.

Las bacterias patógenas y amebas pueden sobrevivir por un tiempo en el suelo y contaminar los vegetales que serán consumidas crudas. El lavado y desinfección de estos alimentos pueden reducir algo del problema, pero no eliminarlo. Los productos cárnicos y el pescado presentan agentes patógenos que son eliminados durante el proceso de cocción, a diferencia de los frutos que se lo consume de forma directa sin ningún proceso de desinfección y los vegetales que en su mayoría no son cocidos ni desinfectados para su consumo.

Existen varios métodos para reducir la flora superficial de frutas y vegetales. Cada método tiene ventajas y desventajas dependiendo del tipo de producto y del proceso. En general los métodos utilizados se basan en procesos físicos y químicos. Entre los métodos físicos podemos mencionar la remoción mecánica, los tratamientos térmicos, y la radiación. Los métodos químicos involucran el uso de agentes químicos como desinfectantes superficiales.

En general estos desinfectantes químicos se emplean en soluciones acuosas por inmersión o aspersion. Dentro de los agentes desinfectantes utilizados para tratar frutas y vegetales se encuentran: compuestos clorados, halogenados, ácidos, amonio cuaternarios y compuestos de oxígeno activo.

Estos desinfectantes como los compuestos clorados presentan ácido hipocloroso que generan irritación en la piel, tracto respiratorio y posible acción cancerígena en tiempos prolongados; los compuestos con amonio cuaternarios no está aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) a menos que el alimento sea pelado antes de consumirlo; los compuestos ácidos orgánicos tienen efectos negativos en propiedades sensoriales y los compuestos de oxígeno activo no es recomendable por el blanqueamiento de pigmentos en algunas frutas y vegetales.

Mediante este proyecto se pretende elaborar un extracto a partir de la semilla de toronja, que será utilizado como desinfectante bactericida orgánico para frutas y vegetales con la finalidad de reducir la mayor parte de la carga microbiana y mejorar la inocuidad de los alimentos al momento de ingerirlas.

### **1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

El país tiene tantas altitudes distintas que hay amplias variaciones climáticas de una parte del país a otra. Como consecuencia, este exquisito país cultiva distintas frutas y vegetales desde zonas tropicales hasta zonas templadas.

Las frutas y vegetales son los principales fuentes de alimentos que consumen los seres humanos para el desarrollo de sus actividades diarias; Estos alimentos son muy propenso a contaminarse con sustancias patógenos proveniente de su entorno productivo, esta contaminación se da en el proceso de riego de los cultivos (el agua no es tratada por lo que sirve de transporte de bacterias, protozoos y materiales fecales), en la cosecha, almacenamiento, transporte y manipulación.

Los pintorescos mercados de Guayaquil ofrecen frutas que son un deleite para todos los sentidos. Allí se venden manzanas, reina claudias, peras, uvas, papayas, limones, mangos y frutas no muy comunes como las granadas, kiwis, quinotos, anonas, guayabas y tamarindos, en donde los más apetecidos por los consumidores son las manzanas, uvas, frutillas, peras y bananos.

Estos alimentos son portadores de agentes patógenos que no son eliminados por los comerciantes, ya que ellos sólo lavan con agua para limpiar la tierra excesiva que se encuentra en la superficie de la fruta mejorando así su apariencia, sin tomar en cuenta el uso de agentes desinfectante para mantener la inocuidad del alimento. Sumando a esto la manipulación de la fruta por el consumidor al momento de ser llevada al hogar, y que solamente es lavada con agua para su posterior consumo.

Pero el hecho de lavar las frutas no basta, hay que desinfectarlo para reducir la carga microbiana con un agente desinfectante orgánico, libre de yodo, cloro o plata coloidal que se lo puede obtener a partir de la semilla de la toronja.

## **1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

Lo expuesto nos permite plantear la siguiente interrogante:

¿Se puede obtener un agente desinfectante bactericida orgánico a partir de la semilla de la toronja que pueda disminuir la carga microbiana que se encuentra en las frutas que se expenden en los mercados de la ciudad de Guayaquil?

## **1.5. DELIMITACIÓN DEL ESTUDIO**

### **1.5.1. Delimitación Espacial**

El problema se lo delimita a los mercados donde se expenden frutas en la ciudad de Guayaquil y a sus consumidores.

### **1.5.2. Delimitación Temporal**

El presente trabajo se lo llevara desde octubre del 2013 hasta noviembre del 2014.

## **1.6. ALCANCE DEL TRABAJO**

### **1.6.1. Alcance Social**

El presente proyecto tiene como alcance disminuir las enfermedades gastrointestinales producidas por las bacterias y microorganismos que se encuentra presentes en las frutas y vegetales que son un gran problema de interés social.

### **1.6.2. Alcance Económico**

Este proyecto tiene como alcance económico ayudar a las familias en reducir los gastos económicos de enfermedades gastrointestinales producidos por agentes patógenos que se encuentran en las frutas que no son eliminados por el agua, debido a que el agua no es un desinfectante.

## **1.7. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.7.1. General:**

Obtener un desinfectante bactericida orgánico a partir de la semilla de la toronja para disminuir la carga microbiana presentes en las frutas que se expende en los mercados de la ciudad de Guayaquil.

### **1.7.2. Específicos:**

Determinar un proceso para la obtención del extracto de la semilla de la toronja para poder aplicarlo como desinfectante bactericida en frutas.

Analizar la eficiencia bactericida del desinfectante orgánico obtenido de la semilla de la toronja para su uso doméstico y comercial.

Concientizar a los consumidores y comerciantes de frutas de los mercados de Guayaquil la importancia que se debe de tener en la desinfección de frutas, para evitar enfermedades producidas por bacterias.

## **1.8. PREGUNTAS A CONTESTAR**

De acuerdo al problema planteado se desprende las siguientes preguntas.

¿Qué proceso se va a aplicar para la obtención del extracto de la semilla de la toronja para aplicarlo como desinfectante bactericida en frutas?

¿Qué tipos de análisis se van a usar para determinar la eficiencia bactericida del desinfectante orgánico obtenido de la semilla de la toronja?

¿Qué medidas pueden ser usadas para concientizar a las personas y comerciantes de frutas de los mercados de Guayaquil para el uso de un agente bactericida orgánico obtenido de la semilla de la toronja?

### **1.9. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA**

Un alimento que se considera de buena calidad microbiológica se considera cuando el conteo de colonias presentes en la caja Petri sea menor de 10000 UFC/cm<sup>2</sup>, es decir que presenta una baja carga microbiana. Con este proyecto se desea ofrecer a los consumidores de frutas y vegetales frescas de gran calidad microbiológica, disminuir los peligros de enfermarse por la ingesta de estos alimentos contaminados.

Con el uso de los desinfectantes orgánico ayudamos a darle valor agregado a los desechos orgánicos como es en este caso la semilla de la toronja, que en muchos casos son desechadas sin tomar en cuentas los beneficios que nos da esta fruta.

## **1.10. HIPÓTESIS**

### **1.10.1. Hipótesis General.**

Mediante este proyecto de investigación es posible obtener un extracto a partir de la semilla de la toronja que sirva como desinfectante bactericida para la disminución de la carga microbiana de las frutas y vegetales que se expende en la ciudad de Guayaquil.

### **1.10.2. Hipótesis específicas.**

Si el extracto obtenido mediante un proceso no cumple con los análisis microbianos no servirá como un desinfectante orgánico.

El desinfectante bactericida obtenido a partir de la semilla de la toronja disminuirá la carga microbiana que se encuentra en una fruta o vegetal en su estado natural.

Se necesitara la concientización a los consumidores y comerciantes de frutas en los mercados de Guayaquil, en la desinfección de los alimentos mediante el uso de agente desinfectantes orgánicos para bajar las enfermedades producidas por agentes patógenos.

## **1.11. VARIABLES**

### **1.11.1. Variable Dependiente**

Como variable dependiente del proyecto de investigación se tiene:

El método de extracción para la obtención del extracto de la semilla de la toronja.

### **1.11.2. Variables independientes**

Pre-proceso de las semillas

Análisis microbiológico

## 1.12. OPERACIONALIZACION DE LA VARIABLE

<b>Variable Dependiente</b>	<b>Variable Independiente</b>	<b>Variable Conceptual</b>	<b>Indicador</b>	<b>Escala</b>	<b>Unidad de medida</b>
<b>Método de extracción para la obtención del extracto de la semilla de la toronja</b>	Pre-proceso de la semillas	Presentación de la semilla para el proceso de extracción	Análisis Granulométrico	Numérico	Micras
	Análisis microbiológico	Conteo de colonias microbianas presentes en la muestra a evaluar	Análisis en laboratorio	Numérico	Ufc/ml Ufc/cm <sup>2</sup>

## II. CAPITULO 2

### REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1. ANTECEDENTE INVESTIGATIVO

La actividad biológica de las semillas de Pomelo fueron observadas por primera vez por el Dr. Jacob Harich, físico nuclear yugoslavo, que emigró a los Estados Unidos en 1957, y más concretamente a Florida en 1963. Jardinero de afición, observó que las semillas de Pomelo permanecían intactas en su compostera, sin llegar a descomponerse como ocurría con el resto de desechos biológicos. Este hecho provocó su curiosidad científica, ya que no entendía cómo era posible que estas semillas, a diferencia del resto de las semillas de otros cítricos, permaneciesen inalteradas por los microorganismos propios de la descomposición biológica.

#### 2.2. TORONJA

##### 2.2.1. Generalidades

El árbol del pomelo (*Citrus × paradisi*), a veces llamado pomelero o toronjo, es un la familia de las rutáceas, cultivado por su fruta que es el pomelo, toronja (del árabe turungah) o pomelo rosado. Es un híbrido, probablemente producido de manera espontánea entre la pampelmusa y la naranja dulce (*Citrus × sinensis*) en las plantaciones del mar Caribe al rededor del siglo XVII.

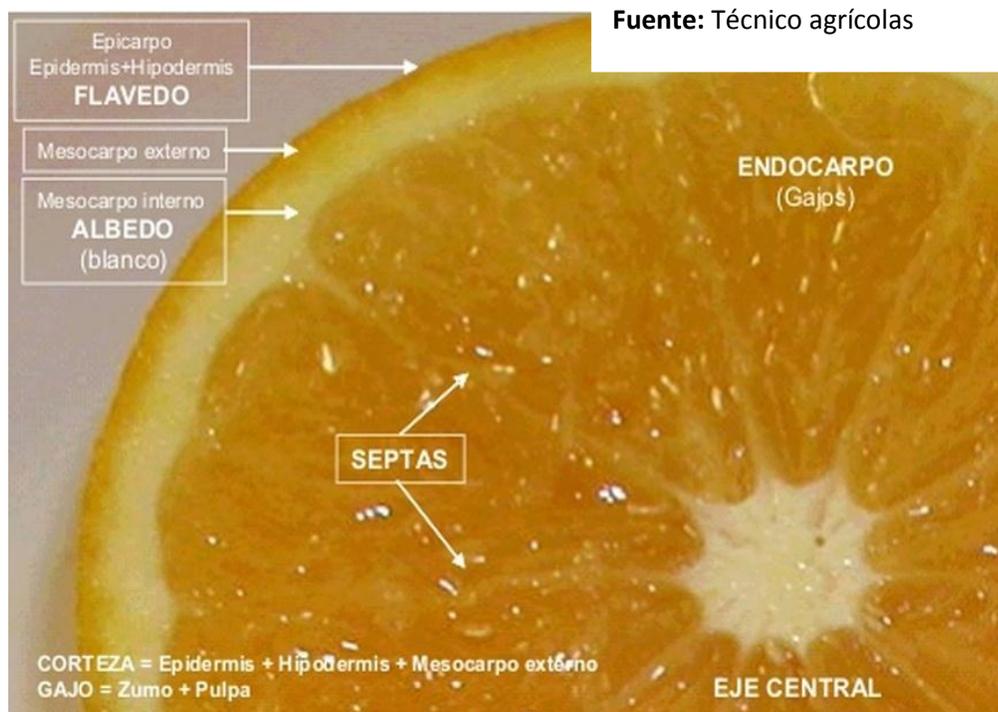
Árbol auranciáceo, de la familia de las rutáceas. Sus características morfológicas son similares a los demás citrus de tronco reducido, corto y de copa compacta, brotes color púrpura y pocas espinas. La toronja uno de los cítricos más sensibles al frío; las flores no resisten temperaturas inferiores a un grado bajo cero, por lo que su cultivo se restringe a climas semi-tropicales, templados y también a altitudes próximas al nivel del mar. (FAO, 2006)

Posee unas raíces pivotantes y profundas que requieren de suelos frescos, sueltos y bien drenados. Los hoyos para su plantación no deben ser inferiores a 70X70 centímetros. Puede sembrarse por semilla pero los frutos resultan regresivos, así que los árboles obtenidos por este procedimiento solo se utilizan como porta injerto. En la actualidad se utilizan con plántones injertados sobre mandarina.

**Hojas:** de tamaño intermedio, algo vellosas, con alas grandes, nervios muy marcados y olor típico.

**Flores:** grandes de color verdoso y estambres reducidos.

**Fruto:** de forma globular achatada de color amarillo claro y de grandes dimensiones, puede alcanzar un diámetro de 15 cm a 20 cm, de aroma muy grato, es un hesperidio. Consta de: exocarpo (flabelo: presenta vesículas que contienen aceites esenciales), mesocarpo (albedo: pomposo y de color blanco) grueso y endocarpo (pulpa: presenta tricomas con jugo) blanco, rosa o rojo. (FAO, 2006)



**Figura. 1. Partes de la toronja**

## 2.2.2. Variedades

### 2.2.2.1. Toronjas blancas o comunes

**Duncan:** árbol vigoroso, grande y muy productivo; su fruto es de mayor tamaño que el de la variedad Marsh y el árbol es más resistente al frío. Sabor excelente, pulpa muy firme y jugosa, buena acidez y niveles de azúcar elevados, dando un sabor equilibrado, rico y dulce. Elevado número de semillas (30-50 por fruto), pero a pesar de ello sigue siendo el punto de referencia en cuanto a calidad. La presencia de semillas no es un obstáculo para su industrialización dados el sabor y la firmeza de los gajos, siendo una variedad muy indicada para la transformación en zumo. (FAO, 2006)

**Marsh (Marsh seedles):** se obtuvo a partir de semilla de la variedad Duncan. Procede de Florida (EE.UU.). Árbol vigoroso y muy productivo, de tamaño grande y más sensible al frío. El fruto es algo más pequeño que Duncan, pero el número de semillas es mucho menor (2-3 por fruto). El contenido de zumo es alto y dicho zumo es dulce, aunque con acidez elevada al comienzo de la cosecha. Esta variedad permanece más tiempo en el árbol (hasta tres meses), aunque a finales de cosecha la acidez es baja y el sabor un tanto insípido. Es la variedad más importante del mundo, adecuada para la industria de refrescos. (FAO, 2006)

, fuente: [www.infoagro.com](http://www.infoagro.com)



**Figura 2: variedad de toronjas**

### 2.2.2.2. Toronjas Pigmentadas

Deben su color al pigmento licopeno, a diferencia de las naranjas, en las que el color se debe a las antocianinas. El licopeno se genera cuando las temperaturas son elevadas. La popularidad de las toronjas pigmentadas se ha incrementado en las dos últimas décadas en muchos países, aunque no ha ocurrido así en Japón. (FAO, 2006)

**Burgundy:** probablemente se originó a partir de la variedad Thompson. Es una variedad tardía que se mantiene en el árbol hasta comienzos del verano en buenas condiciones comerciales. La corteza es lisa y su color no acompaña a la intensa coloración interna en tono marrón. Escaso número de semillas (1-2), pulpa firme, muy jugosa, con sabor dulce y poco amargo. (FAO, 2006)

**Ruby (Ruby red, Redblush, Henninger):** estas variedades se originaron en la misma zona de Texas, probablemente al mismo tiempo y muchos expertos piensan que se trata de la misma variedad. Mutación espontánea de Thompson. Sin semillas. Madura aproximadamente al mismo tiempo que la toronja Thompson, pero presenta mejor calidad interna y mejor pigmentación interna y externa. La intensidad de la pigmentación aumenta con la temperatura ambiente. Es la primera variedad de toronja rosa que permitió una rápida identificación por la coloración externa sin necesidad de ser partida. (FAO, 2006)

**Star Ruby:** fue obtenida mediante la irradiación de una semilla de la variedad Hudson en Texas en 1959. La pulpa es de coloración más intensa y la coloración externa es superior a la de las variedades más recientes. Presenta escasas semillas (1-2, en algunos frutos). La corteza es muy delgada, el contenido de zumo es muy alto y el sabor más dulce y menos amargo que el de Marsh y otras variedades pigmentadas. Es la toronja estándar con la que se suelen comparar otras variedades. (FAO, 2006)

**Thompson o Pink Marsh:** fue la primera variedad pigmentada sin semillas. Se originó como mutación espontánea de Marsh Seedles en Florida en 1913. Las características del árbol y del fruto son muy similares a las de la variedad Marsh, ya que sólo difiere en dos aspectos: es de madurez algo más precoz y la pulpa es ligeramente rosa en la

zona próxima a las membranas de los gajos, aunque este color tiende a mitigarse con el paso del tiempo. (FAO, 2006)

### **2.2.3. Propiedades Nutritivas**

El agua es el principal componente de este cítrico, por lo que el pomelo posee un escaso valor calórico, a expensas básicamente de los hidratos de carbono.

En cuanto a las vitaminas, destaca por su riqueza en vitamina C y ácido fólico. El contenido en carotenoides, pigmentos que confieren a los vegetales el color anaranjado rojizo, no es significativo salvo en las variedades de pulpa de color oscuro, con independencia del color de la piel. (casapia, 2008)

Respecto al contenido mineral, destacan el potasio y el magnesio. Abundan en el pomelo los ácidos málico, oxálico, tartárico y cítrico, éste último potencia la acción de la vitamina C; responsables de su sabor y de los que dependen diversas propiedades que se le atribuyen al pomelo. (casapia, 2008)

La cantidad de fibra no es representativa y ésta se encuentra sobre todo en la parte blanca entre la pulpa y la corteza, por lo que su consumo favorece el tránsito intestinal.

El pomelo destaca por su extraordinaria riqueza en vitamina C (40 mg/100 g). Una pieza de 200 g cubre las necesidades diarias de esta vitamina en un adulto sano. La vitamina C interviene en la formación de colágeno, huesos y dientes, glóbulos rojos y favorece la absorción del hierro de los alimentos y la resistencia a las infecciones. (casapia, 2008)

Otras vitaminas existentes en menor concentración son la provitamina A y el ácido fólico. La provitamina A o beta caroteno se transforma en vitamina A en nuestro organismo conforme éste lo necesita. Dicha vitamina es esencial para la visión, el buen estado de la piel, el cabello, las mucosas, los huesos y para el buen funcionamiento del sistema inmunológico. Ambas vitaminas, cumplen además una función antioxidante. (casapia, 2008)

El ácido fólico interviene en la producción de glóbulos rojos y blancos, en la síntesis material genético y la formación anticuerpos del sistema inmunológico.

En lo que se refiere a su contenido mineral, el pomelo es rico en potasio (190mg/100g) y flúor (0,04 mg), además de aportar cierta cantidad de calcio (14 mg) y magnesio (10 mg) y un bajo contenido en sodio (2 mg). Esta fruta es una de las menos calóricas.

El potasio es un mineral necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso y para la actividad muscular normal, interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula. (casapia, 2008)

Su pulpa tiene un gran contenido en agua y fibra (0,8%) y una cantidad moderada de hidratos de carbono (6%) con escasos lípidos y proteínas.

Si se toma en ayunas incrementa su capacidad depurativa, diurética y laxante y al mismo tiempo es un eficaz estimulante del apetito.

Hoy en día se conoce que los componentes no nutricionales del pomelo son los responsables de sus beneficiosos efectos sobre la salud del ser humano.

Entre sus acciones más importantes, el pomelo:

- ✓ Favorece la digestión y el trabajo depurativo del hígado, la vesícula y los riñones,
- ✓ Disminuye los niveles de colesterol en sangre y protege el sistema vascular, reduciendo la formación de trombos,
- ✓ Impide la proliferación de células cancerosas, y
- ✓ Es un poderoso antioxidante, muy útil en la prevención de enfermedades degenerativas y el envejecimiento.

Los responsables de estos efectos son sustancias como la pectina, flavonoides, limonoides y carotenoides.

**La pectina** es un tipo de fibra vegetal soluble que se encuentra en la piel blanca de los cítricos. Concretamente en el pomelo se encuentra en la fibra que forma su pulpa y en la capa blanquecina que se encuentra debajo de la corteza y entre los gajos.

Estudios científicos han demostrado que la pectina impide la multiplicación de las células cancerosas, a la par que muestra efectos anticolesterol y protege la pared de las arterias, gracias a su acción antioxidante e inhibidora de la formación de trombos o placas ateroscleróticas. (casapia, 2008)

**Los flavonoides** forman parte de los llamados elementos fitoquímicos, estando ampliamente repartidos entre los vegetales. Químicamente son glucósidos.

El flavonoide más importante del pomelo es la naringina (que se transforma en el organismo en naringenina), de propiedades fluidificantes de la sangre, antioxidantes y anticancerígenas. (casapia, 2008)

**Los limonoides** son terpenoides que constituyen la esencia de los cítricos. El pomelo es especialmente rico en uno de ellos, el limoneno, al que debe su sabor amargo, y que también presenta propiedades anticancerígenas.

**Los carotenoides**, presentes fundamentalmente en los pomelos de pulpa roja, potencian la acción antioxidante. (casapia, 2008)

**Tabla 1.** Valor Nutricional del pomelo

<b>VALOR NUTRICIONAL DEL POMELO EN 100 G DE SUSTANCIA COMESTIBLE</b>	
Agua (g)	88.4
Proteínas (g)	0.6
Lípidos (g)	0.1
Carbohidratos (g)	9.8
Calorías (kcal)	39
Vitamina A (U.I.)	80
Vitamina B1 (mg)	0.04
Vitamina B2 (mg)	0.02
Vitamina B6 (mg)	0.02
Ácido nicotínico (mg)	0.2
Ácido pantoténico (mg)	0.25
Vitamina C (mg)	40
Ácido málico (mg)	80
Ácido cítrico (mg)	1460
Sodio (mg)	2
Potasio (mg)	198
Calcio (mg)	17
Magnesio (mg)	10
Manganeso (mg)	0.01
Hierro (mg)	0.3
Cobre (mg)	0.02
Fósforo (mg)	16
Azufre (mg)	5
Cloro (mg)	3

Valor nutricional de pomelo por 100g de sustancia comestibles

**fuelle:**([www.infoagro.com](http://www.infoagro.com))

#### **2.2.4. Usos**

Sus frutos en fresco se consumen en las comidas, de entrada o de postre, y transformados en mermeladas o en zumos, tanto naturales como concentrados. La industria aprovecha un 20% de su producción, principalmente para la elaboración de zumos y pequeñas cantidades para mermeladas. (FAO, 2006)

De la cáscara se extrae un aceite esencial muy utilizado en perfumería; esta esencia es soluble en aceite de parafina, tiene un aroma fresco y combina bien con aceite esencial de limón, lima, nerolí, azahar y verbena. Entra en combinaciones de perfumes del tipo limón, aroma de gardenia, flor de azahar y Chipre. (FAO, 2006)

El zumo de toronja combate el letargo y la sequedad de la garganta y el olor estimula el hemisferio derecho del cerebro, agudiza la memoria y la concentración.

### **2.3. EXTRACCIÓN**

La extracción es la técnica más empleada para separar un producto orgánico de una mezcla o de una fuente natural, también puede definirse como la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente.

Este método permite separar el producto que se desea y dejar en la mezcla los productos secundarios o bien extrae los productos secundarios y dejar el principal. Para lo cual hay que tener en cuenta la regla de solubilidad que dice “Lo semejante disuelve a los semejante”, es decir que los solutos polares solo pueden disolverse en solventes polares y los no polares en solventes no polares. (Mejia, 2011)

#### **2.3.1. Métodos de Extracción**

Los métodos de extracción pueden ser de dos tipos: Extracción Líquido – Líquido y Sólido - Líquido

**Extracción Líquida - Líquida;** consiste en la transferencia de una sustancia de una fase a otra, llevándose a cabo entre dos líquidos inmiscibles. Las dos fases líquidas de una extracción son la Fase Acuosa y la Fase Orgánica. (Mejia, 2011)

En este caso el componente se encuentra disuelto en un disolvente A (generalmente agua) y para extraerlo se utiliza un disolvente B (un solvente orgánico como éter etílico, benceno, etc.) los que son inmiscibles entre sí. Los disolventes A y B se agitan en un embudo de separación y se deja reposar hasta que se separen las dos fases o capas, permitiendo que el compuesto presente se distribuya en las capas de acuerdo a sus Solubilidades Relativas. (Mejia, 2011)

**Extracción Sólido - Líquido;** consiste en la separación de uno o más componentes de una mezcla sólida mediante un disolvente líquido. Tiene lugar en dos etapas, existe un contacto del disolvente con el sólido que cede el componente soluble (solute) al disolvente. Este proceso puede llevarse a cabo a temperatura ambiente (percolación) o en caliente, en este caso a fin de evitar la pérdida de disolvente, suele realizarse una ebullición a reflujo. (Mejia, 2011)

En la segunda parte hay una separación de la disolución del resto del sólido. Una vez que se ha saturado el disolvente, se separa del sólido que queda, normalmente por filtración

### **2.3.2. Métodos de Extracción de principios activos**

En cuanto a los métodos de extracción de los principios activos de las plantas, existen diversas técnicas según el tipo de especie a emplear, de la concentración y propiedades de dichos principios, de que se trate de ejemplares frescos o desecados (Buenas Tareas, 2011)

Cuando utilizamos el AGUA como vehículo extractivo reciben el nombre genérico de TISANAS: son preparaciones acuosas en las que se aprovecha el poder de extracción

que el agua posee. Manteniendo el agua en contacto con la planta ésta cede parte de sus principios activos a la misma, cede aquellas sustancias que son solubles en agua. Ocurre un fenómeno de difusión celular. Una vez que la planta ha sido inhibida ("quellung"), es decir, impregna de agua, vuelve a reconstruir el estado que tenía la planta fresca los procedimientos habituales son:

### **2.3.2.1. Infusión:**

Método más frecuente de extracción de principios activos de una planta, es muy adecuada para las drogas aromáticas, ya que los aceites esenciales que contienen se evaporan a temperaturas mayores que las precisas para preparar la infusión. (Buenas Tareas, 2011)



**Figura. 3. Infusión digestiva**

La infusión se realiza sumergiendo las partes más tiernas: hojas o flores y tallos tiernos de la planta (normalmente depositar 2-3 gramos de las hojas o flores) en una cantidad de agua hirviendo (dependiendo de la planta pueden ser partes enteras, como las semillas del lino); se deja reposar unos 5 -10 minutos y se filtra a continuación mediante un tamiz o papel de filtro. (Buenas Tareas, 2011)

Entre las infusiones más utilizadas tenemos las siguientes: infusión de diente de león, infusión de manzanilla, infusión de anís, infusión de té verde, infusión de tila.

### **2.3.2.2. Decocción:**

La decocción o cocimiento es el método de extracción de los principios activos de una planta consistente en hacerla hervir en agua a fuego lento desde 3 minutos a 30 min., generalmente sobre las partes más duras de la misma desmenuzadas de raíces, tallos, cortezas o semillas y dejarla reposar con un tiempo mínimo de 10 minutos. Para realizar el proceso se verterán unas 6 cucharaditas de hierba seca o el doble de fresca en  $\frac{3}{4}$  de litro de agua. Se enciende el fuego hasta que hierva y mantenerlo así hasta que el líquido se reduzca en una tercera parte, es decir, sobre el medio litro lo cual se producirá normalmente entre los 20 minutos y la media hora. Normalmente se toma entre 2-3 tazas diarias. (Buenas Tareas, 2011)

Entre las decocciones más utilizadas tenemos las siguientes: decocción de cola de caballo, decocción de raíces de regaliz, decocción de sauce.



**Figura. 4. Decocción**

### 2.3.2.3. Maceración:

Es el método de extracción de los principios activos de una planta consistente en dejar reposar una hierba en agua fría durante un periodo considerable de tiempo que puede oscilar entre unas 6 horas y varias semanas. (Buenas Tareas, 2011)

En fitoterapia, las plantas son maceradas en agua, vino, vinagre o alcohol durante un tiempo que oscila entre unas horas y varios días. Una maceración puede servir en uso interno y en uso externo. (Buenas Tareas, 2011)

La maceración se realiza con unos 50 gramos de planta por un litro de líquido, aunque se puede diluir incluso hasta la mitad (20gr. De planta por litro de agua)



Fuente: olinovembre.es

**Figura. 5. Maceración de Aceites Aromatizados**

Esta forma de extracción se suele emplear para plantas ricas en mucílagos como las semillas de lino Existen 3 tipos de maceraciones:

- a) Maceraciones acuosas: Se realizan en agua. Para ello, en caso de flores u hojas se dejara reposar en un recipiente con agua durante 12 horas. En caso de partes más duras, como corteza, raíces, tallos o semillas se deberán dejar reposar durante 24 horas.

- b) Maceraciones aceitosas: La maceración se realiza en aceite. En este caso el tiempo de maceración puede durar entre 1 mes y medio año.
- c) Maceraciones alcohólicas: cuando la maceración se realiza en alcohol. En este caso el proceso puede alargarse desde varias semanas a varios meses. A veces hace falta años para conseguir una maceración completa. Una vez macerado el producto debe colocarse y guardarse en un recipiente opaco. Normalmente se toman de 2-3 tazas al día en caso de maceraciones acuosas y una copa al día si se trata de maceraciones alcohólicas (Buenas Tareas, 2011)

Entre las maceraciones más utilizadas tenemos: maceración de semillas de linaza en agua, maceración de ciruelas en agua, maceración de raíz de genciana en aguardiente, maceración de semillas de hinojo en vino blanco.

#### **2.3.2.4. Digestión:**

La digestión es una maceración a temperatura elevada cuyo líquido de extracción es agua. Con la desventaja que al enfriar generalmente se producen precipitaciones. (Buenas Tareas, 2011)

Se trata de macerar la planta en agua a temperatura media, alrededor de 50°C, durante un tiempo determinado. Se utiliza sobre todo para el agotamiento de las drogas resinosas o cuando los disolventes empleados son grasos (preparación de aceites medicamentosos). (Buenas Tareas, 2011)

#### **2.3.2.5. Percolación o Lixiviación:**

En este caso el agua, alcohol u otro disolvente atravesaría una columna llena de planta pulverizada, arrastrando durante el proceso los principios activos. Ej. Café. Según como se aplique el agua, las tisanas se pueden obtener de varias formas, por ello los métodos más comunes y sencillos son la infusión, maceración y decocción (Buenas Tareas, 2011)



Fuente: unperiodico.unal.edu.com

**Figura. 6. Percolación de valeriana pannonii**

Otra forma, radicalmente distinta de extracción de principios activos, es:

**Los zumos o jugos:** Que pueden ser acuosos o grasos. Así tenemos, zumo de naranja, aceite de oliva, resinas de coníferas, bálsamos diversos e incluso jugos animales (opoterapia). Normalmente se emplean para este tipo de extracción prensas hidráulicas, calor o diversos artilugios mecánicos, como licuadoras, etc.

El agua tiene un poder extractivo relativamente pequeño, comparada con otros disolventes también empleados. Uno de ellos y el más usado es el ALCOHOL en diversas graduaciones. Muchas de las preparaciones extractivas (extractos) se realizan con este disolvente. Otros disolventes utilizados pueden ser: éter, cloroformo, acetona, etc. (Buenas Tareas, 2011)

#### **2.4. EXTRACTO DE SEMILLA DE TORONJA**

La semilla de toronja, medicamento de valor incalculable, descubierto a finales del siglo XX, pero, conocido por la medicina natural hace muchos siglos atrás. Las semillas de la toronja, utilizadas como medicamento, es un descubrimiento sin precedentes que la ciencia médica avala como medicina de primer orden para controlar múltiples patologías, al punto de superar a infinidad de fármacos en su aplicación terapéutica, pues su eficacia para combatir aproximadamente 800 tipos de bacterias y un gran número de parásitos nocivos para la salud humana, la convierte en un medicamento de

invalorable aplicación médica. A lo largo de los siglos las semillas de una gama de frutas fueron consideradas medicinas, pero, la ciencia médica moderna, reivindica la aplicación terapéutica de estos recursos naturales, para solucionar los graves problemas de salud del presente siglo.



**Fuente:** Técnico agrícolas

**Figura 7. Semilla de toronja**

El extracto de semilla de pomelo (ESP) es un compuesto antimicrobiano de amplio espectro no tóxico sintetizado a base de las semillas, pulpa y membranas blancas del pomelo. (casapia, 2008)

Se ha demostrado su capacidad in vitro para matar o inhibir el crecimiento de una gran cantidad de bacterias Gram negativas y Gram positivas potencialmente perjudiciales, hongos, virus y parásitos protozoarios. Los estudios in vivo, más costosos, se han limitado a estudios puntuales de toxicidad, pero su utilización, cada vez más importante, ha determinado que el extracto de semilla de pomelo presente una gran cantidad de aplicaciones clínicas, y lo que es más importante, sea efectivo a muy bajos niveles de concentración. (casapia, 2008)

El líquido resultante es muy ácido y amargo, de ahí que se incorpore a la preparada glicerina vegetal pura que disminuye la acidez y el sabor amargo. La relación extracto de semilla de pomelo y glicerina suele oscilar en función del proveedor del producto.

El producto final es una combinación de elementos naturales que incluyen bioflavonoides, aminoácidos, ácidos grasos, oligosacáridos, compuestos polifenólicos (quercitina, hesperidina, neohesperidina, glicósido de camperol, naringina, apigenina, rutinósidos, poncirina, etc.), tocoferoles, ácido ascórbico y ácido dihidroascórbico (casapia, 2008)

#### **2.4.1. Poder Antimicrobiano**

La capacidad de una sustancia para impedir el crecimiento bacteriano y de otros gérmenes se cuantifica a través de la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC en inglés), siendo ésta la medida de laboratorio más utilizada para medir la efectividad antimicrobiana de una sustancia. La Concentración Inhibitoria Mínima expresa la mínima cantidad de esa sustancia que se requiere para prevenir e impedir el crecimiento de un microorganismo bajo condiciones de laboratorio. (casapia, 2008)

Se expresa en partes por millón (ppm). Un número bajo, como 3 ppm, indica que la capacidad antimicrobiana es muy efectiva inhibiendo el crecimiento del germen testado a una muy baja concentración de dicha sustancia. A medida que el MIC se hace mayor la efectividad de esa sustancia para impedir la proliferación bacteriana se hace menor y deberemos utilizar dicha sustancia a una mayor concentración. El MIC no expresa la capacidad de una sustancia para matar un germen.

En la tabla (Anexo 1) aparecen ensayos realizados con el ESP en determinadas cepas bacterianas tanto Gram negativas como positivas, hongos y levaduras. Dichos ensayos no implican necesariamente su efectividad en ensayos in vivo. El ESP ha demostrado ser efectivo a relativas bajas concentraciones frente a distintos microorganismos que aparecen reflejados también al final de la tabla, pero su MIC no ha sido determinado. (casapia, 2008)

## 2.5. ANTIBACTERIAL DEFINICIÓN

Un antibiótico antibacterial es un agente que o bien mata o inhibe el crecimiento de un microorganismo.

El término antibiótico antibacterial fue utilizado por primera vez en 1942 por Selman Waksman y sus colaboradores en los artículos de revistas para describir cualquier sustancia producida por un microorganismo que es antagónica al crecimiento de otros microorganismos en alta dilución. Esta definición excluye las sustancias que matan las bacterias, sino que no se producen por microorganismos (tales como los jugos gástricos y peróxido de hidrógeno). También excluye sintéticos compuestos antibacterianos tales como las sulfonamidas. Muchos compuestos antibacterianos son relativamente pequeñas moléculas con un peso molecular de menos de 2.000 unidades de masa atómica. (APUA, 2013)

Con los avances en la química médica, la mayoría de los antibacterianos modernos son semisintéticos modificaciones de diversos compuestos naturales. Estos incluyen, por ejemplo, los antibióticos beta-lactámicos, que incluyen las penicilinas (producidas por hongos del género *Penicillium*), las cefalosporinas, y los derivados del carbapenem. Los compuestos que todavía están aislados de los organismos vivos son los aminoglucósidos, mientras que otros antibacterianos, por ejemplo, las sulfonamidas, las quinolonas y las oxazolidinonas se producen sólo por síntesis química. De acuerdo con esto, muchos compuestos antibacterianos se clasifican sobre la base de la química /biocinética origen en naturales, semisintéticos y sintéticos. Otro sistema de clasificación se basa en la actividad biológica; en esta clasificación, los antibacterianos se dividen en dos grandes grupos en función de su efecto biológico sobre los microorganismos: bactericidas agentes matan a las bacterias y agentes bacteriostáticos ralentizan o se estancan crecimiento bacteriano. (APUA, 2013)

### 2.5.1. Antibacterianos comunes

**Tabla 2.** Grupos de Sustancias antibacterianas

<b>Grupo de sustancias</b>	<b>Sustancia</b>	<b>Grupo de sustancias</b>	<b>Sustancia</b>
<b>alcoholes</b>	etanol	<b>fenoles y cresoles</b>	fenol
	isopropanol		cresol
<b>aldehídos</b>	glutaraldehído	<b>bisfenoles</b>	triclosan
	formaldehído		hexaclorofeno
<b>compuestos que liberen halógenos</b>	Compuestos de Cloro	<b>metales pesados</b>	Los compuestos de plata
	compuestos de yodo		compuestos de mercurio
<b>peróxidos</b>	peróxido de hidrógeno	<b>biguanidas</b>	biguanidas poliméricas
	peróxido de ozono		alexidina
	ácido peracético		clorhexidina
<b>sustancias gaseosas</b>	óxido de etileno	<b>compuestos de amonio cuaternario</b>	cetrimida
	formaldehído		cloruro de benzalconio
<b>anilidas</b>	triclocarbano		cloruro de cetilpiridinio
<b>halofenoles</b>	PCMX (p-cloro-m-xilenol)		

**Fuente:** Alliance for the Prudent Use of Antibiotics

Antibacterianos pueden ser divididos en dos grupos en función de su velocidad de acción y residuo de producción:

El primer grupo contiene los que actúan con rapidez para destruir las bacterias, pero desaparece rápidamente (por evaporación o descomposición) y no dejan residuos

activo detrás (referido como residuo no productoras).Ejemplos de este tipo son los alcoholes, cloro, peróxidos y aldehídos. (APUA, 2013)

El segundo grupo consiste principalmente de compuestos más nuevos que dejan residuos largo que actúan sobre la superficie a desinfectar y por lo tanto tienen una acción prolongada (referido como residuo productoras).Ejemplos comunes de este grupo están triclosán, triclocarbán, y cloruro de benzalconio. (APUA, 2013)

### **2.5.2. Regulación de Antibacteriales**

Sea o no un agente antibacteriano está regulada depende de su uso previsto y su eficacia. La Food and Drug Administration de EE.UU. (FDA) regula los jabones antibacterianos y sustancias antibacterianas que, o bien ser utilizados en el cuerpo o en los alimentos procesados, incluyendo envoltorios de comida y los agentes se añade al agua involucrada en el procesamiento de alimentos. Si una sustancia no está diseñada para su uso en o en el cuerpo, que se ha registrado por la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPA) bajo la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas. Las sustancias se registran ya sea como agentes antimicrobianos de salud pública o de salud no pública. (APUA, 2013)

### **2.5.3. Beneficios de los Antibacteriales**

Los antibacterianos son definitivamente eficaces para matar las bacterias, sin embargo, existe una gran controversia en torno a sus beneficios para la salud. Los que no producen residuos se han utilizado durante muchos años y siguen siendo agentes eficaces para el control de organismos patógenos en una amplia variedad de cuidado de la salud y el ámbito doméstico. Cuando se usa bajo estrictas directrices de aplicación, los agentes productores de residuos han demostrado ser eficaces en el control de la infección de bacterias y hongos en el ámbito clínico como hospitales,

hogares de ancianos, salas de neonatología y otros centros de salud donde puede haber un alto riesgo de infección. (APUA, 2013)

A algunos productos de consumo pocos han demostrado efectividad para condiciones específicas: pasta de dientes antibacterial ayuda periodontal al control (de las encías); desodorantes antibacterianos suprimen las bacterias que causan el olor, y controlar la caspa champús anticaspa ayuda. Sin embargo, hasta la fecha, no hay evidencia para respaldar las afirmaciones de que los antibacterianos proporcionan beneficios adicionales para la salud cuando es utilizado por los consumidores en general (APUA, 2013)

#### **2.5.4. Diferencias entre Antibacterial, Desinfectante y Esterilizadores.**

La EPA clasifica los antimicrobianos de salud pública como bacteriostáticos, sanitizantes, desinfectantes y esterilizadores basados en qué tan efectivos son en la destrucción de los microorganismos. (APUA, 2013)

- Los bacteriostáticos inhiben el crecimiento bacteriano en ambientes inanimados.
- Los sanitizantes son sustancias que matan a un cierto porcentaje de microorganismos de prueba en un período de tiempo determinado.
- Los desinfectantes destruyen o inactivan irreversiblemente todos los microorganismos de prueba, pero no necesariamente sus esporas.
- Esterilizadores destruyen todas las formas de bacterias, hongos y otros microorganismos y sus esporas.

Los desinfectantes pueden clasificarse como agentes de amplio espectro o limitadas. Un desinfectante de amplio espectro destruye ambas bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Un desinfectante de amplio espectro limitado debe especificar claramente los microorganismos específicos contra los que trabaja. (APUA, 2013)

## 2.6. MICROORGANISMO PRESENTES EN LAS FRUTAS Y VEGETALES

La microbiota dominante sobre las hortalizas recién cosechadas es muy variable. Está constituida por bacterias Gram negativos como *Enterobacter*, *Pantoea* y *Pseudomonas*, Pero las partes que crecen cerca o dentro del suelo contienen bacterias Gram positivas, por ejemplo *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium* y organismo corineformes. Sobre las superficies de algunas verduras se propagan los *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Muchos de estos organismos son pectinolíticos o celulolíticos y originan el reblandecimiento característico de las podredumbres blandas, por ejemplo *Pectobacterium carotovorum*. (Bejarano NV C. L., 2007)

Los hongos filamentosos aislado de las hortalizas con más frecuencia son *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Phoma*, *Chaetomium* y en menor proporción *Aspergillus*, *Acremonium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Trichoderma*, *Ulocladium*, etc. Algunos de estos mohos son patógenos oportunista, mientras que otros son patógenos verdaderos que pueden invadir el tejido sano.

Las levaduras aisladas de las frutas pertenecen a los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon*, *Zygosaccharomyces* y otros; En condiciones normales las nueces, almendras y otras frutas secas no presentan problemas de deterioro bacteriano debido a la baja actividad de agua, pero pueden ser dañadas por insectos y contaminadas por mohos. (Bejarano NV C. L., es. slideshard.net. enfoque metodologicos, 2012)

### III. CAPITULO 3.

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 3.1. Metodología de la Investigación

#### 3.1.1. Tipos y Enfoques Metodológicos

Es un conjunto de proceso sistemático, crítico y empírico que se aplican al estudio de un fenómeno.

Podemos señalar dos enfoques:

- El enfoque cualitativo
- El enfoque cuantitativo

##### 3.1.1.1. Enfoque Cualitativo.

Se usa el enfoque cualitativo en los estudios de los diferentes tipos de métodos y técnicas para la extracción del agente activo de la semilla de toronja para optimizar su poder bactericida como agente desinfectante.

##### 3.1.1.2. Enfoque Cuantitativo.

Se aplica el enfoque cuantitativo a los datos experimentales y a los análisis microbiológicos que permitirán comprobar la eficiencia del extracto de semilla de toronja como agente desinfectante en el momento de conteos de colonias de bacterias, mohos y levaduras; como también la presencia de areolas en la inhibición de bacterias.

### **3.1.2. Métodos y técnicas de investigación**

#### **3.1.2.1. Métodos de investigación**

Los Métodos que se usó para recopilar la información necesaria son:

- Documental

Se emplea la investigación documentada al estudiar las diferentes técnicas para la extracción del agente activo de las diferentes semillas.

- Campo

Se aplica la investigación de campo, cuando se recorrió por los diferentes mercados de la ciudad de Guayaquil para la recolección de información sobre la desinfección de frutas.

#### **3.1.2.2. Técnicas de investigación**

Las técnicas que se usó para recopilar la información necesaria son:

- Observación
- Encuesta

### **3.2. Experimentación (diseño)**

#### **3.2.1. Materia prima (Semilla de toronja)**

La semilla de la toronja se lo obtuvo en los distintos puestos y carretas que expenden jugos de frutas en la ciudad de Guayaquil, que se recolectaron día a día hasta obtener

una cantidad adecuada para ser procesado en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad de Guayaquil.

### 3.2.2. Equipos y materiales

- Rota vapor
- Balanza
- Secador (estufa)
- Autoclave
- Incubadoras
- Molienda
- Frasco de color ámbar
- Matraz de Erlenmeyer
- Vaso de precipitación (Baker)
- Probetas
- Pipetas
- Cajas Petri
- Contador de colonias (lupa)
- Hisopos
- Espátulas y cucharas
- Tubos de ensayo



**Figura 8 y 9:** Rotavapor y Contador de Colonias

**Fuente:** Wagner Macías

#### 3.2.2.1. Reactivos

- Etanol
- Agua de peptona
- Agar:
  - Mac konky
  - Nutritivo
  - Potato de extrose
  - Plate count

### **3.2.3. Técnicas del proceso en laboratorio.**

#### **Proceso de obtención del extracto de la semilla de toronja**

El proceso a utilizar es la técnica de maceración, que inicia desde:

1. recolección de las semillas de las toronjas, la cual se secura en una estufa a 70°C.
2. Se muele las semillas y se procede a depositar en un recipiente de color ámbar al cual también se le agrega el etanol a 98°.
3. Se lo mantiene en maceración a una temperatura de 25°C y se lo agita manualmente el recipiente de dos a tres veces al día durante 5 semanas para poder tener una mejor extracción.
4. Después del tiempo transcurrido, la muestra se filtra y se lo procede a concentrar en el equipo de Rota vapor al vacío, a 80°C de temperatura, -0,24 Bar de vacío y revoluciones de 15 rpm.
5. El extracto evaporado se lo rotula y se mantiene herméticamente cerrado en un lugar de ambiente fresco.
6. Antes de aplicar el extracto de la semilla de toronja a las frutas para desinfectar, se realizó un análisis previamente al extracto, que consiste lo siguiente métodos:

El método Kirby-Bauer, el método recuento de microorganismo aerobios mesófilos o recuento estándar en placa (TPC), y el recuento de moho y levadura.

#### **Preparativos de los análisis microbiológicos.**

##### a) Kirby-Bauer o método de difusión por disco:

- Se prepara el Agar Mac Konky y el Agar Nutritivo.
- Para el Mac Konky se coloca 50 g de polvo de Agar en 1 lt de agua purificada y dejar reposar por 5 min.
- Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición a 1 a 2 min. hasta disolver completamente.

- Distribuir en las cajas Petri y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.
- Para preparar el Agar Nutritivo se colocan en frasco cerrado en baño maría y llevar a ebullición para fundir el medio de cultivo sólido contenido en el mismo.
- Una vez fundido, retirar los frascos y dejar enfriar hasta temperatura de 45-50°C
- Se abre y se lo distribuye aproximadamente 15 ml del Agar en las cajas Petri estériles.
- Se toman otras cajas Petri que ya contienen las sepas de bacterias Gran Negativa (Mac Konky) y de bacterias en general (Nutritivo) y con una aza esterilizada individualmente se hace un arrastre por las estrías donde se encuentran las bacterias
- Se lo adiciona en agua de peptona cada una individualmente como si se enjuagara el aza.
- Se agita el agua de peptona y con hisopo se traspasa del agua de peptona a las cajas con el Agar esterilizada respectivamente, haciéndolo frotar con el hisopo en tres direcciones diferentes que abarque toda la superficie del Agar que contiene la caja.
- Se toman cuatros discos de papel filtro ya esterilizado previamente y se le van agregando por separado a distintas concentraciones del EST de 5, 10, 20 y 100%; con volúmenes 20, 50, 200 y 250 µg/ml por duplicado.
- Los discos se lo van colocando en las cajas Petri que contienen dichos agares, (se coloca cuatros discos en cada caja Petri)
- Las cajas ya enumeradas se incuban durante 24 horas a 37°C de temperatura.
- Luego de este tiempo se verifica el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco.

b) Método de recuento estándar en placas (TPC):

- Pipetear 1ml de muestra (EST) y se lo deposita en un tubo de ensayo que contiene 9ml de solución agua de peptona (1x10) y se agita (se usan diferentes disoluciones del EST en agua).

- Luego de esta disolución (1x10) se pipetea 1ml se adiciona nuevamente a un nuevo tubo que contenga 9 ml de solución de agua de peptona (1x100) y agitar sucesivamente hasta obtener las diluciones deseadas.
- La siembra se lo realiza en una cámara de flujo laminar debidamente desinfectada, se procede a pipetear 1ml de la disolución que vamos a inocular (1x10; 1x100) por duplicado en las correspondientes cajas Petri debidamente rotuladas.
- Se agrega 15ml de Plate count Agar (PCA) fundido.
- Mezclar las cajas con movimientos cuidadosos, moviendo las cajas de arriba hacia abajo 5 veces, rotando las cajas 5 veces en el sentido de la aguja del reloj y rotando 5 veces en sentido contrario a la aguja del reloj.
- Se deja solidificar el Agar.
- Colocar las cajas sin invertir en motones de 6 dentro de la incubadora a 35°C durante 48 horas.
- Colocar una caja Petri con medio sin inocular como control de esterilidad (blanco).
- Al cabo de las 48 horas se sacan las cajas Petri de la incubadora y se observa la formación de colonias en la placa, se procede a su conteo.
- Con el resultado del conteo se calcula el promedio de microorganismo por ml de muestra.

$$AEROBIOS = \frac{A + B}{2} \times 100$$

AEROBIOS= Contaje total en placa

A= Número de colonias de la primera placa en dilución 1x100

B= Número de colonias de la segunda placa en dilución 1x100

c) Recuento de Moho y Levadura:

- Pipetear 1ml de muestra (EST) y se lo deposita en un tubo de ensayo que contiene 9ml de solución agua de peptona (1x10) y se agita.
- La siembra se lo realiza en una cámara de flujo laminar debidamente desinfectada, se procede a pipetear 1ml de la disolución que vamos a inocular (1x10) por duplicado en las correspondientes cajas Petri debidamente rotuladas.
- Agregar 15 ml de Potato de extrose (PDA) fundido previamente esterilizado y enfriado a 40°C
- Mezclar las cajas con movimientos cuidadosos, moviendo las cajas de arriba hacia abajo 5 veces, rotando las cajas 5 veces en el sentido de la aguja del reloj y rotando 5 veces en sentido contrario a la aguja del reloj.
- Dejar solidificar el Agar.
- Colocar las cajas sin invertir en motones de 8 dentro de la incubadora a 25°C durante 5 días.
- Colocar una caja Petri con medio sin inocular como control de esterilidad (blanco).
- Al cabo de los 5 días se sacan las cajas Petri de la incubadora y se observa la formación de colonias en la placa, se procede a su conteo.
- Con el resultado del conteo se calcula el promedio de microorganismo por ml de muestra.

$$MOHOS Y LEVADURAS = \frac{A + B}{2} \times 10$$

MOHOS Y LEVADURAS= Contaje total en placa

A= Número de colonias de la primera placa en dilución 1x10

B= Número de colonias de la segunda placa en dilución 1x10

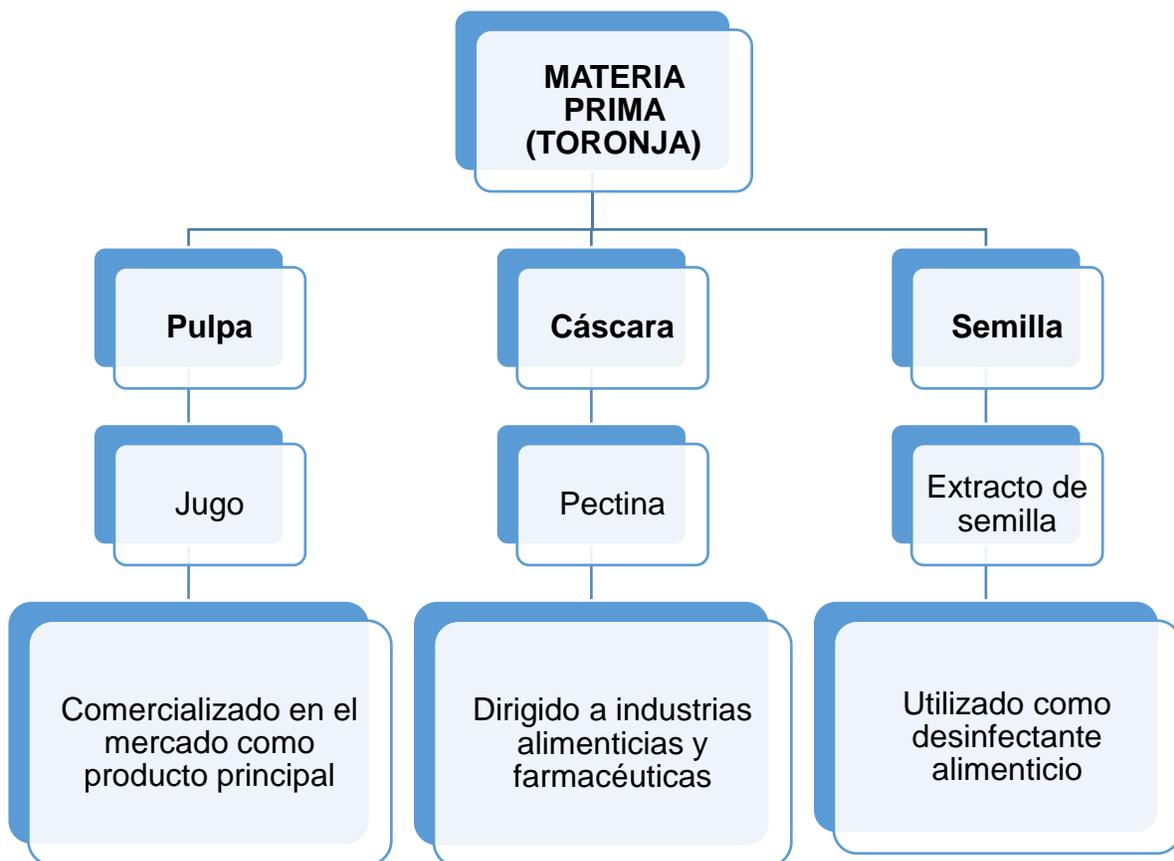
7. Se preparara diferentes tipos de concentraciones de la solución con agua potable y el extracto de la semilla de toronja (5,10, 20 y 100%), las frutas a evaluar se enjuaga con agua potable para eliminar la tierra presente en el contorno y luego se sumergen en las soluciones preparada con el EST durante 15 minutos máximos; se lo retira y se lo deja escurrir.
8. Con los hisopos se toman las muestras en el contorno de la fruta (frutillas y uvas) y vegetal (se usó el tomate), una vez antes y una vez después de la aplicación del EST para hacer una comparación de ambos.
9. El hisopo entra en contacto con el agua de peptona, se lo agita por unos minutos y luego se adiciona 1 ml a la caja Petri.
10. Se le agrega el respectivo Agar tanto el Potato de extrose en dos cajas Petri que son para los aerobios, y plate count en otras dos cajas Petri que son para moho y levadura, tratando de cubrir toda la parte inferior interna de la placa; luego del cultivo se lo lleva a las incubadoras,
11. Si son para aerobios se lo deja por 24 horas si son para moho y levaduras se lo deja por 5 días en incubadoras diferentes, al final se cuentan las colonias presentes en las placas, se comparan y se interpreta los datos obtenidos.

### 3.3. Ingeniería de proceso

#### 3.3.1. Diagrama de flujo de proceso

Mediante estos diagramas se demuestra el aprovechamiento general de la fruta de la toronja, que permite una producción sustentable con el mínimo de desecho, obteniendo tres diferentes tipos de productos que son el jugo a partir de la pulpa de la fruta, pectina a partir de la cáscara y un extracto a partir de la semilla de la toronja como producto desinfectante.

**Figura 10:** Diagrama del aprovechamiento integral de la toronja.

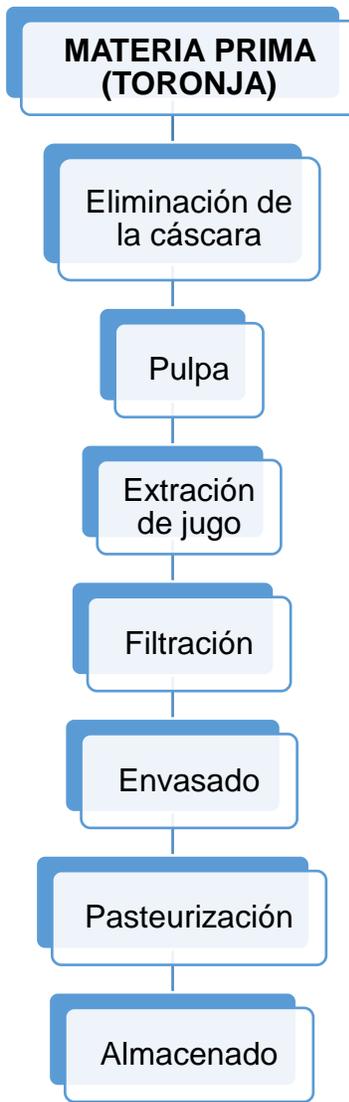


**Fuente:** Esbán Escobedo A.

Como producto principal se tiene el jugo de toronja a partir de la pulpa obteniendo un jugo de buena calidad, con características optimas que nos permite hacerlo de una manera natural para su comercialización. Algunas de las principales alternativas de industrialización de la toronja son las siguientes:

- Jugo de toronja natural.
- Concentrado congelado de toronja.
- Refresco de toronja.
- Refresco de frutas con toronja como ingrediente.

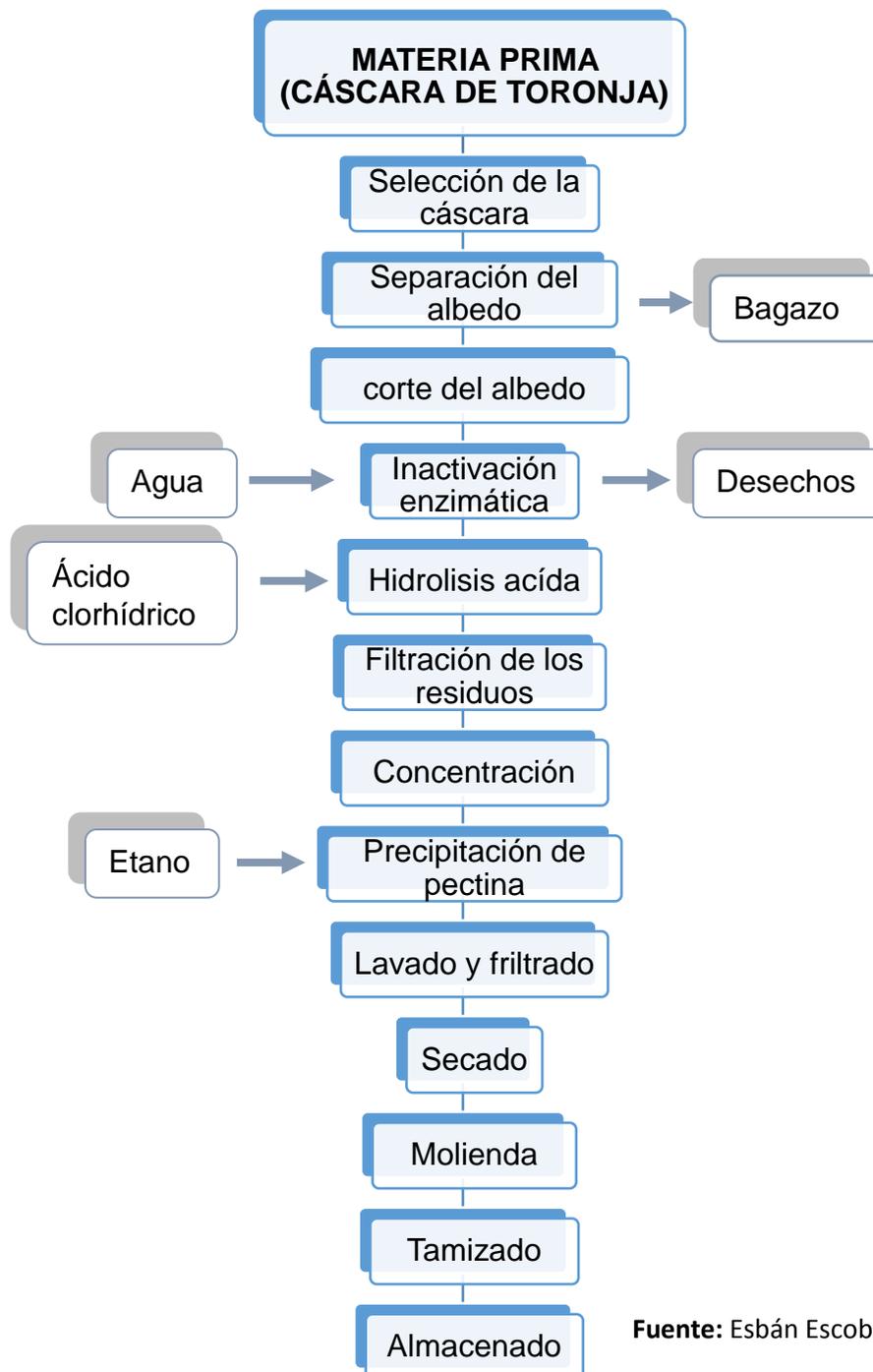
**Figura 11:** Diagrama de la elaboración de jugo de toronja



**Fuente:** Esbán Escobedo A.

Otro producto que se puede obtener es la pectina que se extrae de la cascara, se utiliza como especie de aditivo para los alimentos para darle características espesante, emulsificantes y estabilizantes; en mermeladas y gelatinas

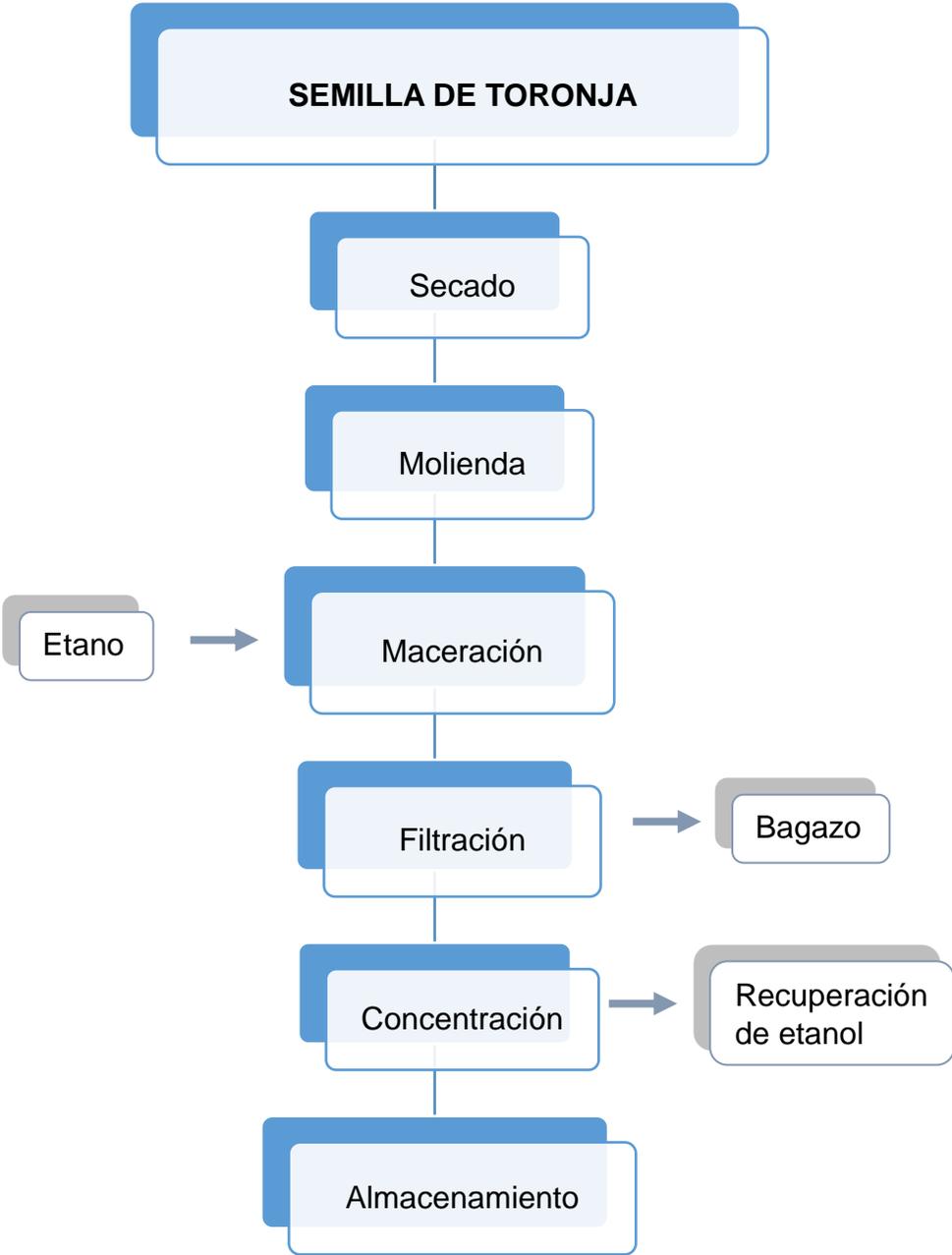
**Figura 12:** Diagrama de la obtención de pectina a partir de la cáscara de toronja



Fuente: Esbán Escobedo A.

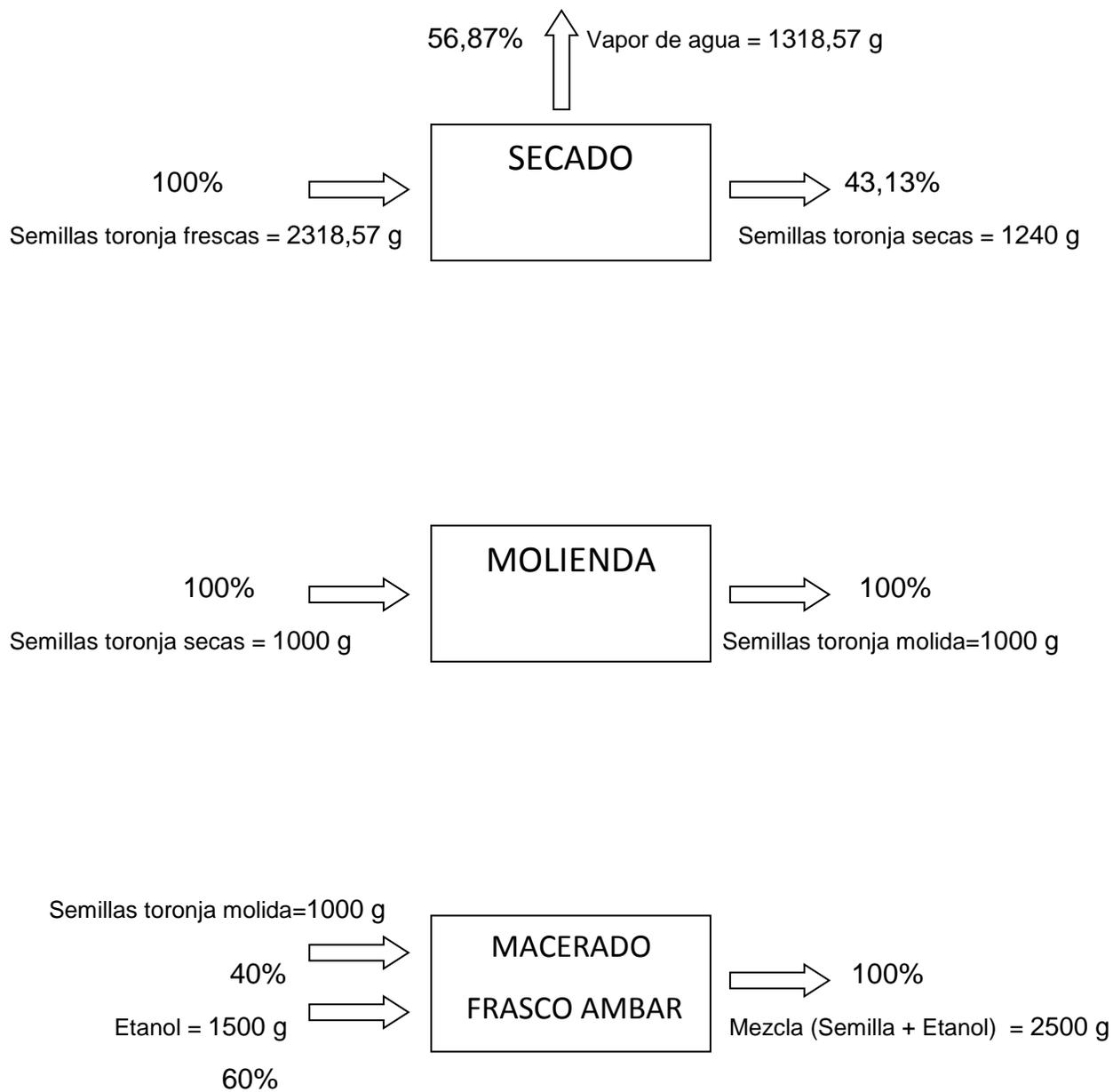
Diagrama principal que demuestra el proceso de obtención del extracto de la semilla de toronja como uso de desinfectante bactericida en frutas y vegetales.

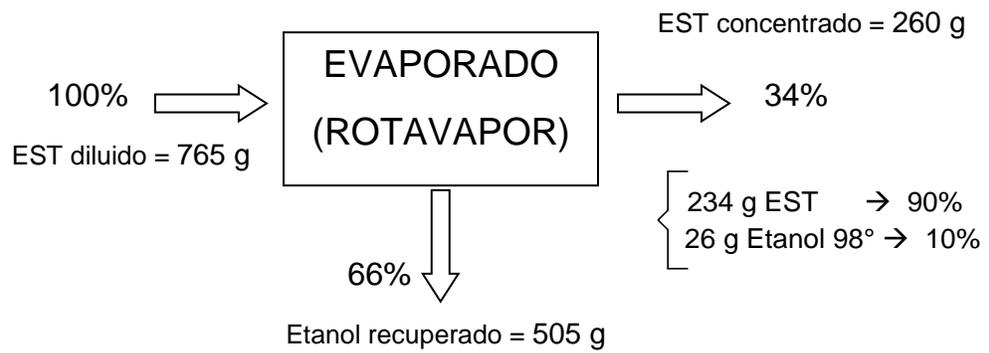
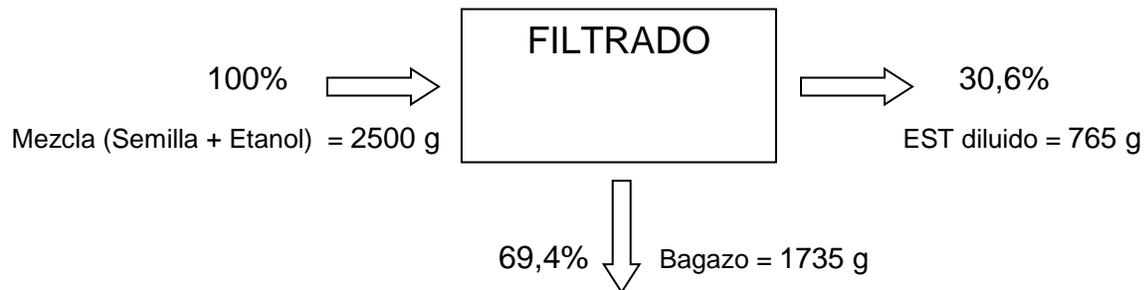
**Figura 13:** Diagrama de la obtención del extracto de semilla de toronja



**Fuente:** Wagner Macías S.

### 3.3.2. Diagrama por equipo del proceso





#### IV. CAPITULO 4.

### ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

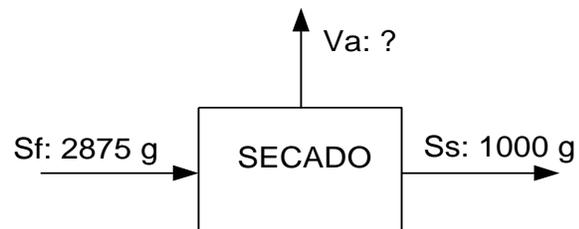
#### 4.1. Balance de materia

##### a) Secado

Datos:

Peso de semilla fresca (Sf): 2318,57 g

Peso de semilla seca (Ss): 1000 g



$$\text{Entrada} = \text{Salida}$$

$$Sf = Ss + Va$$

$$2318,57g = 1000g + Va$$

$$Va = 1318,57g$$

$$Va = 56,87 \% \text{ de agua eliminada}$$

##### b) Maceración

Datos:

Peso de semillas secas (Ss): 1000 g

Solvente (S): 1500 g



$$Ss + S = \text{Mezcla}$$

$$\text{Mezcla} = 1000 + 1500 \text{ g}$$

$$\text{Mezcla} = 2500g = 2,5kg$$

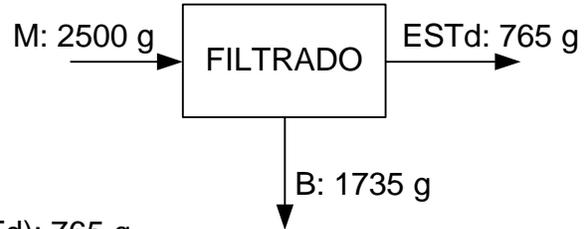
### c) Filtrado

Datos:

Mezcla (M): 2500 g

Bagazo (B): 1735 g

Extracto de semilla de toronja diluida (ESTd): 765 g



$$\text{Entrada} = \text{Salida}$$

$$M = ESTd + B$$

$$2500g = ESTd + 1715 g$$

$$ESTd = 2500g - 1735 g$$

$$ESTd = 765 g = 30,6 \% \text{ de producto}$$

### d) Evaporación

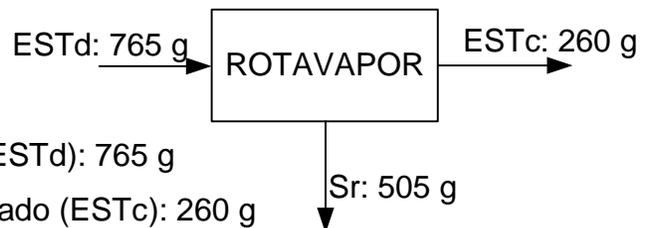
Datos:

Extracto de semilla de toronja diluido (ESTd): 765 g

Extracto de semilla de toronja concentrado (ESTc): 260 g

Solvente recuperado (Sr): 505 g

% ESTc: ?



$$ESTc = 260 g$$

$$\%ESTc = \frac{260}{765} \times 100 = 34\%$$

$$\frac{26}{260} \times 100 = 10\% \text{ Etanol } 98^\circ$$

$$\frac{234}{260} \times 100 = 90\% \text{ EST}$$

## 4.2. Resultados experimentales

### 4.2.1. Análisis microbiológico del producto

#### 4.2.1.1. Método Kirby-Bauer

El método Kirby-Bauer (método de difusión en Agar) es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico, este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas.

Para la práctica se preparó por separado cuatro distintas concentraciones del extracto con agua de clorada en 5, 10, 20 y 100%; con volúmenes de 20, 50, 200 y 250 µg/ml

**Tabla 3:** Resultados de inhibición microbiana para Bacteria Gran Negativa

<b>Presencia de halo (∅ mm) de inhibición microbiano en cajas petri con Agar Mac Konky</b>				
<b>Concentración (%)</b>	<b>Volumen µg/ml</b>			
	<b>20</b>	<b>50</b>	<b>200</b>	<b>250</b>
5	0	0	0	0
10	0	0	0	0
20	0	0	0	0
100	0	0	0	0

**Fuente:** Wagner Macías S.

**Tabla 4:** Resultados de inhibición microbiana para Bacteria en general

<b>Presencia de halo (Ø mm) de inhibición microbiano en cajas petri con Agar Nutritivo</b>				
<b>Concentración (%)</b>	<b>Volumen µg/ml</b>			
	<b>20</b>	<b>50</b>	<b>200</b>	<b>250</b>
5	0	0	0	0
10	0	0	0	0
20	0	0	0	0
100	0	0	0	0

**Fuente:** Wagner Macías S.

#### 4.2.1.2. Método de recuento estándar en placa

##### **Resultado de los análisis del extracto de la semilla de toronja**

Los resultados que se obtuvo fueron del análisis del extracto de la semilla de toronja diluido con agua de clorada en concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 100% para comparar la efectividad del extracto para inhibir los microorganismos.

**Tabla 5:** Resultado de los análisis microbianos de aerobios mesófilos del extracto de la semilla de toronja en diferentes concentraciones en agua de clorada.

<b>DILUCIÓN DEL EST CON AGUA DECLORADA</b>					
<b>CONCENTRACION %</b>	<b>COLONIAS EN PLACA</b>		<b>COLONIAS TOTALES</b>	<b>COLONIAS PROMEDIO</b>	<b>TPC X 100</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>			
1	0	0	0	0	<b>0</b>
5	0	0	0	0	<b>0</b>
10	0	0	0	0	<b>0</b>
20	0	0	0	0	<b>0</b>
100	0	0	0	0	<b>0</b>

**Fuente:** Wagner Macías S.

**Tabla 6:** Resultado de los análisis microbianos de moho y levadura del extracto de la semilla de toronja en diferentes concentraciones en agua declorada.

<b>DILICIÓN DEL EST CON AGUA DECLORADA</b>					
<b>CONCENTRACION</b>	<b>COLONIAS EN PLACA</b>		<b>COLONIAS TOTALES</b>	<b>COLONIAS PROMEDIO</b>	<b>M y L X 10</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>			
1	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0

**Fuente:** Wagner Macías S.

### **Resultado de los análisis microbiológicos en las frutas.**

Resultados de las tomas de muestras de un antes y después de ser enjuagados con agua potable de uvas, frutillas y tomates frescos recién adquiridos en los mercados de la ciudad de Guayaquil.

**Tabla 7:** Resultado de los análisis microbianos de aerobios mesófilos de las uvas, frutillas y tomates frescos

<b>RESULTADOS MICROBIOLÓGICO DE UVAS, FRUTILLAS Y TOMATES FRESCOS</b>					
<b>FRUTAS Y VEGETAL ANALIZADAS</b>	<b>COLONIAS EN PLACA</b>		<b>COLONIAS TOTALES</b>	<b>COLONIAS PROMEDIO</b>	<b>TPC X 100</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>			
Uvas	Inc.	Inc.	Incontables	Incontables	<b>Inc.</b>
Frutillas	Inc.	Inc.	Incontables	Incontables	<b>Inc.</b>
Tomates	Inc.	Inc.	Incontables	Incontables	<b>Inc.</b>

**Fuente:** Wagner Macías S.

**Tabla 8:** Resultado de los análisis microbianos de moho y levadura de las uvas, frutillas y tomates frescos

<b>RESULTADOS MICROBIOLÓGICO DE UVAS, FRUTILLAS Y TOMATES FRESCOS</b>					
<b>FRUTAS Y VEGETAL ANALIZADAS</b>	<b>COLONIAS EN PLACA</b>		<b>COLONIAS TOTALES</b>	<b>COLONIAS PROMEDIO</b>	<b>TPC X 100</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>			
Uvas	Inc.	Inc.	Incontables	Incontables	<b>Inc.</b>
Frutillas	Inc.	Inc.	Incontables	Incontables	<b>Inc.</b>
Tomates	Inc.	Inc.	Incontables	Incontables	<b>Inc.</b>

**Fuente:** Wagner Macías S.

**Tabla 9:** Resultado de los análisis microbianos de aerobios mesófilos de las uvas, frutillas y tomates enjuagados con agua potable.

<b>RESULTADOS MICROBIOLÓGICO DE UVAS, FRUTILLAS Y TOMATES LAVADOS CON AGUA POTABLE</b>					
<b>FRUTAS Y VEGETAL ANALIZADAS</b>	<b>COLONIAS EN PLACA</b>		<b>COLONIAS TOTALES</b>	<b>COLONIAS PROMEDIO</b>	<b>TPC X 100</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>			
Uvas	Inc.	Inc.	Incontables	Incontables	<b>Inc.</b>
Frutillas	Inc.	Inc.	Incontables	Incontables	<b>Inc.</b>
Tomates	Inc.	Inc.	Incontables	Incontables	<b>Inc.</b>

**Fuente:** Wagner Macías S.

**Tabla 10:** Resultado de los análisis microbianos de moho y levadura de las uvas, frutillas y tomates enjuagados con agua potable.

<b>RESULTADOS MICROBIOLÓGICO DE UVAS, FRUTILLAS Y TOMATES LAVADOS CON AGUA POTABLE</b>					
<b>FRUTAS Y VEGETAL ANALIZADAS</b>	<b>COLONIAS EN PLACA</b>		<b>COLONIAS TOTALES</b>	<b>COLONIAS PROMEDIO</b>	<b>TPC X 100</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>			
Uvas	Inc.	Inc.	Incontables	Incontables	<b>Inc.</b>
Frutillas	Inc.	Inc.	Incontables	Incontables	<b>Inc.</b>
Tomates	76	122	198	99	<b>990.</b>

**Fuente:** Wagner Macías S.

La aplicación del extracto fue usada para desinfectar uvas, frutillas y tomates; a una concentración al 10% del extracto de semilla de toronja diluida en agua potable.

**Tabla 11:** Resultado de los análisis microbianos de aerobios mesófilos de las uvas, frutillas y tomates desinfectados con el EST al 10%

<b>AGUA DE ENJUAGE AL 10% DE EST</b>					
<b>FRUTAS Y VEGETAL ANALIZADAS</b>	<b>COLONIAS EN PLACA</b>		<b>COLONIAS TOTALES</b>	<b>COLONIAS PROMEDIO</b>	<b>TPC X 100</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>			
Uvas	3	2	5	2,5	<b>250</b>
Frutillas	12*	16*	28*	14*	<b>1400*</b>
Tomates	1	1	2	1	<b>100</b>

**Fuente:** Wagner Macías S.

\*Las colonias que se presentan en las TPC de las frutillas; no son bacterias, son colonias de hongos.

**Tabla 12:** Resultado de los análisis microbianos de moho y levadura de las uvas, frutillas y tomates desinfectados con el EST al 10%

<b>AGUA DE ENJUAGE AL 10% DE EXTRACTO DE SIMILLA DE TORONJA</b>					
<b>FRUTAS Y VEGETAL ANALIZADAS</b>	<b>COLONIAS EN PLACA</b>		<b>COLONIAS TOTALES</b>	<b>COLONIAS PROMEDIO</b>	<b>M y L X 10</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>			
Uvas	0	0	0	0	<b>0</b>
Frutillas	16	13	29	14,5	<b>145</b>
Tomates	16	10	26	13	<b>130</b>

**Fuente:** Wagner Macías S.

### **4.3. Análisis e interpretación de los resultados**

Los datos obtenidos por el método de Kirby Bauer no fueron favorables para este tipo de extracto obtenido por maceración ya que no presentaron ninguna aureola o halo de inhibición alrededor del papel filtro, Este método funciona mejor para otras clases de extractos como por ejemplo los de aceites esenciales.

Al no tener resultados positivos por el método de Kirby Bauer, se opta otro método que es el método de Recuento Estándar en Placas (TPC) y el recuento de moho y levadura, obteniendo mejores resultados que el método anterior.

Al comienzo de esta investigación y al poso que iba tomando forma el proyecto nos topamos con muchos problemas, desde métodos de extracción no favorables hasta llegar con uno más efectivo. Se aplicaron extracciones de las semillas de toronja frescas con agua por trituración, extracción por trituración de las semillas de toronja usando como solvente el etanol, extracción tras extracción (estilo batería) por trituración de las semillas con etanol, extracción del aceite de la semillas de toronja por extracción, extracción por soxhlet con semillas de toronja secas usando el etanol como solvente y

hasta extracción por maceración de semillas de toronja frescas con etanol; todos estos métodos no fueron favorables. Llegando a aplicar un método mas prolongado que consistía en una maceración de la semilla de toronja previamente secada y usando como solvente etanol al 98% por varias semanas, teniendo resultados factibles.

Los resultados obtenidos de los análisis microbianos, tomados desde el momento que se compran las frutas o vegetales en los mercados de Guayaquil, al ser lavados con agua potable, desinfectados con los productos comerciales y comparando con el extracto obtenido a partir de la semilla de la toronja, revelan resultados muy comparativos; Las frutas frescas, un antes y después de ser lavados con agua potable no representa gran diferencia en la eliminación de microorganismo (**ver fotos anexo**), al aplicar el EST se demuestra la efectividad de la misma, disminuyendo la carga microbiana con un inicio de unidades formadoras de colonias incontables a la reducción de bacterias a 250, 1400 y 100 UFC/cm<sup>2</sup> en uvas, frutillas y tomates respectivamente; en moho y levadura de 0, 145 y 130 UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente.

En las placas TPC donde fue usado el Extracto de Semilla de Toronja, no se observa la presencia de colonias de Bacterias pero si la presencia de Hongos principalmente en la muestra tomadas en frutillas, demostrando una mayor efectividad como desinfectante bactericida que como fungicida; al ser aplicado el extracto de la semilla de toronja en las placas de Moho y Levadura también se demuestra la disminución de UFC/ cm<sup>2</sup>. (**Ver fotos anexo**).

#### 4.4. Comparación de datos obtenidos

Se logro ser una gran comparación de un alimento recién comprado, lavado y desinfectado con el EST, donde se logro demostrar la disminución de la carga microbiana; las frutas frescas al ser lavadas con agua disminuyen parte de su carga microbiana pero aun a si es muy alta y se las consideras \*incontables; se consideran incontables a  $> 10000 \text{ UFC/cm}^2$  en bacterias y  $> 500 \text{ UFC/cm}^2$  en moho y levadura.

**Tabla 13:** Comparación de bacterias presentes en los alimentos de un antes y después de ser lavados y desinfectados con el EST.

Producto a tratar	Diferencias de UFC/cm <sup>2</sup> de Bacterias		
	Frescas	Lavadas con agua	Tratadas con EST
Uvas	Incontable	*Incontable	250
Frutillas	Incontable	*Incontable	1400
Tomates	incontable	*Incontable	100

Fuente: Wagner Macías S.

**Tabla 14:** Comparación de bacterias presentes en los alimentos de un antes y después de ser lavados y desinfectados con el EST.

Producto a tratar	Diferencias de UFC/cm <sup>2</sup> de Moho y Levaduras		
	Frescas	Lavadas con agua	Tratadas con EST
Uvas	Incontable	*Incontable	0
Frutillas	Incontable	*Incontable	145
Tomates	incontable	*Incontable	130

Fuente: Wagner Macías S.

\*Visualmente se encuentra una diferencia en la reducción de colonias en frutas frescas y al ser lavada con agua potable, pero aun en sí son incontables.

## CONCLUSIÓN

Con los resultados experimentales que se obtuvieron en la realización del presente proyecto, nos permite las siguientes conclusiones:

- Por el método de extracción por maceración se obtuvo el extracto de la semilla de toronja con mayor efectividad para la desinfección de frutas y vegetales, reduciendo la mayor parte de la carga microbiana y mejorando así la inocuidad del alimento.
- Los flavonoides presentes en la semilla de la toronja son los principales agentes activos que permitieron reducir la carga microbiana de UFC incontables a reducirla considerablemente a aceptables.
- El extracto de la semilla de la toronja tiene buena efectividad para combatir bacterias en general y a algunos tipos de hongos, como son los mohos y levaduras.
- El extracto de la semilla de la toronja puede ser usado en cualquier tipo de frutas, vegetales y lugares de trabajo donde se procesan y manipulan alimentos e ingerirlas sin necesidad de enjuagarlas nuevamente ya que es un producto 100% orgánico que no causa daño al organismo, obtenida de la semilla de la toronja y usando como solvente el etanol.
- Mediante este proyecto, los ciudadanos de Guayaquil se pueden concientizar del beneficio que se obtiene en usar un desinfectante para alimento, mas aun siendo el extracto de la semilla de toronja un producto orgánico.
- Este proyecto es viable para las industrias que trabajan directamente con la fruta de la toronja para darle rentabilidad aun desecho obteniendo en si un subproducto.

## RECOMENDACIÓN

- Es aconsejable acudir a los diferentes expendedores de jugos naturales que se encuentra a en la ciudad de Guayaquil, para la recolección de las semillas de toronjas con el motivo de reducir costos y tiempo, ya que al comprar la fruta el gasto económico no justifica la cantidad de semillas obtenidas.
- Es recomendable secar las semillas de toronjas antes de proceder a la extracción ya que el agua que esta contiene afecta en el producto final, dándonos altas contaminaciones microbiológicas en el extracto de la semilla de la toronja.
- El método mas aconsejable a usar es el de la maceración usando como solvente el etanol por ser un solvente no perjudicial para la salud, aunque es un proceso de extracción muy lenta fue la que mejor resultados nos dio en los análisis microbiológicos.
- Al macerar es recomendable usar un recipiente de color ámbar, mantenerlo en lugar oscuro a una temperatura de 25°C y agitar el recipiente de unas dos a tres veces al día para asegura su contacto directo del solvente con las semillas molidas.
- Al evaporar hay que tratar de retirar la mayor cantidad del solvente para obtener un extracto de semilla de toronja al 90%, depositarlo en un recipiente dejándolo bien cerrado y mantenerlo en un ambiente fresco.
- La dosis ETS recomendada para la desinfección de los alimentos es al 10% en dilución en agua potable, dejándolo por inmersión entre 10 a 15 min sin necesidad de enjuagar nuevamente.
- Es recomendable que antes de desinfectar los alimentos con el extracto de la semilla de la toronja es necesario lavarlos con agua potable para retirar la suciedad excesiva que se encuentran en algunas frutas y vegetales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agropecuaria, C. d. (2013,19 de febrero). *Monografía de la Toronja*. Gobierno del estado de Veracruz.
- Álvarez, E. I. (Fecha de recepción: julio 2013/Fecha de aceptación: Octubre 2013). *Desarrollo de un proceso para el aprovechamiento integral de la toronja* . México: Instituto Tecnológico Superior de Apatzingán.
- Ana Victoria Carrión Jara, C. R. (2010). *Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica*. Cuenca.
- APUA. (10 de Mayo de 2013). <http://www.tufts.edu/>. Obtenido de [http://www.tufts.edu/http://www.tufts.edu/med/apua/about\\_issue/agents.shtml](http://www.tufts.edu/http://www.tufts.edu/med/apua/about_issue/agents.shtml)
- Ayres JC, M. J. (1980). *Microbiology of Foods*. San Francisco: WH Freeman & Co.
- Bejarano NV, C. L. (2007). *Manual de Microbiología*. San Salvador de Jujuy.
- Bejarano NV, C. L. (2007). *Manual de Microbiología*. San Salvador de Jujuy.
- Bejarano NV, C. L. (22 de 09 de 2012). *es. slideshard.net. enfoque metodologicos*. Recuperado el 16 de 05 de 2014
- Blanco, M. E. (2012). *Extracción de los compuestos fenolicos de las cáscaras de citricos producidos en México*. México: Instituto Politécnico Nacional .
- Buenas Tareas. (16 de Abril de 2011). *Buenastareas.com*. Obtenido de Buenastareas.com: <http://www.buenastareas.com/ensayos/Extraccion-De-Principios-Activos/2007298.html>
- Carrillo, L. (2004). Actividad microbiana . En L. Carrillo, *Microbiología* (pág. Capitulo 3).
- casapia. (15 de octubre de 2008). *www.casapia.com*. Obtenido de [www.casapia.com](http://www.casapia.com/Paginacast/Paginas/Paginasdemenus/MenudeInformaciones/ComplementosNutricionales/Extracto-Semilla-Pomelo.htm): <http://www.casapia.com/Paginacast/Paginas/Paginasdemenus/MenudeInformaciones/ComplementosNutricionales/Extracto-Semilla-Pomelo.htm>
- Davis, P. y. (06/1999). Tratamiento de Inmersión en agua. *Enhancing microbiological safety of fresh orange juice by fruit immersion in hot water and chemical sanitizers*.
- E., W. (1981). *Evaluación Sensorial: Una metodología actual para tecnología de alimentos*. . Santiago de Chile : Talleres Gráficos USACH.
- FAO. (12 de mayo de 2006). [http://www.fao.org/inpho\\_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/TORONJA.HTM](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/TORONJA.HTM). Obtenido de [http://www.fao.org/inpho\\_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/TORONJA.HTM](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/TORONJA.HTM):

[http://www.fao.org/inpho\\_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/TORONJA.HTM](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/TORONJA.HTM)

- Formoso. ((1992)). *2000 Procedimientos industriales al alcance de todos*. México: Editorial Limosa.
- Gabriela Garmendia, S. V. (19 de 09 de 1991). *Métodos para Desinfección de Frutas y Hortalizas*. Recuperado el 12 de 11 de 2014
- Iturrioz, M. G. (Diciembre 2008). Extracto de semilla de pomelo, el antimicrobiano natural. *El mundo del Bienestar* , 1a edición.
- Kahrs, R. (1995). *Principio generales de la desinfección* . Estados Unidos de America: Rev. sci. tech. off. int, Epiz.
- Londoño, J. A. (2008). Extracción y caracterización de Flavonoides. En u. A. Londoño, *Aprovechamiento de residuos de la agroindustria de citricos* (pág. Capítulo 21).
- López L, R. J. (1988). *Eficiencia de desinfectantes en vegetales y frutras*.
- Mejia, G. (3 de Agosto de 2011). *Quimica-Gabriel.blogspot.com*. Obtenido de Quimica-Gabriel.blogspot.com: <http://quimica-gabriel.blogspot.com/2011/08/extraccion.html>
- Moreno, A. V. (2009). *Producción y eficiencia de un insecticida Botánico a partir de semillas de naranja en el parque metropolitano Guanguiltagua*. Quito.
- Palazón I, P. C. (2000). Patología Vegetal. En P. C. Palazón I. Madrid: Sociedad Española de Fitopatología .
- Reyes, M. S. (2007). *Efecto de la variedad y del procesamiento sobre la vida útil de frutillas minimamente procesadas*.
- V., L. L. (2001). Tratamientos de desinfección de lechugas (*Lactuca sativa*) y frutillas (*Fragaria chiloensis*). *Archivos Latinoamericanos de Nutricion; Organo oficial de la Societadd Latinoamericano de Nutrición.*, Vol. 51 N° 4 pag 376.

# **ANEXOS**

**Anexo 1 (Tabla 15):** Ensayos realizados con el ESP en determinadas cepas bacterianas tanto Gram negativas como positivas, hongos y levaduras

<b>Bacterias Gram negativas</b>	<b>Origen</b>	<b>Cepa</b>	<b>MIC</b>
Aerobacter aerogenes	CTTM	413	20
Alcalingenes faecalis	A		2000
Brucella abortus	NCTC	8226	2
Brucella intermedia	A		2
Brucella melitensis	A		2
Brucella suis	A		2
Cloaca cloacae	NCTC	8155	6
Escherchia (E) coli	NCTC	86	2
Escherchia (E) coli	ATCC	9663	6
Escherchia (E) coli	ATCC	11229	16
Escherchia (E) coli	NCTC	9001	6
Haemophilus influenzae	A		660
Klebsiella aerogenes	NCTC	8172	6
Klebsiella edwardsii	NCTC	7242	6
Klebsiella pneumoniae	ATTC	4352	6
Legionella pneumoniae	AISLADA		200
Loefflerella mallei	NCTC	9674	6
Loefflerella pseudomallei	NCIB	10230	20
Moraxella duplex	A		2
Moraxella glucidolytica	A		6
Neisseria catarrhalis	NCTC	3622	660
Pasteurella septica	NCTC	948	2

Pasteurella pseudotuberculosis	C.G.		200
Proteus vulgaris	NCTC	8313	2
Pseudomona aeruginosa	NCTC	1999	2000
Pseudomona aeruginosa	ATCC	15442	250
Pseudomona aeruginosa	ATCC	12055	20000
Pseudomona capacia	C-175	8384	5000
Pseudomona fluorescens	NCTC	4755	2000
Salmonella cholerasuis			50
Salmonella cholerasuis	ATCC	10708	660
Salmonella enteritidis	A	2249	6
Salmonella gallinarum			50
Salmonella typhi	NCTC	8384	6
Salmonella typhimurium	NCTC	5710	6
Salmonella paratyphi A	NCTC	5322	6
Salmonella paratyphi B	NCTC	3176	6
Salmonella pullorum	ATCC	9120	6
Serratia marcescens	A		2000
Shigella dysenteriae	NCTC	2249	2
Shigella flexneri	NCTC	8192	6
Shigella sonnei	NCTC	7240	3
Vibrio cholerae	A		200
Vibrio eltor	NCTC	8457	200

**Fuente:** (casapia, 2008)

<b>Hongos y Levaduras</b>	<b>Origen</b>	<b>Cepa</b>	<b>MIC</b>
Aspergillus niger	ATCC	6275	600
Aspergillus flavis	ATCC	9643	78
Aspergillus fumigatus	ATCC	9197	200
Aureobasidium pullulans	ATCC	9348	10
Candida albicans	A		60
Candida albicans	ATCC	10259	60
Chaetomium globosum <sup>o</sup> ATCC	ATCC	6205	3
Epidermophyton floccosum	ATCC	10227	200
keratinomyces ajelloi	A		200
Monilia albicans			10
Penicilium roqueforti	ATCC	6989	5
Saccharomyces cerevisiae			60
Trichophytum metagrophytes	ATCC	9533	20
Trichophytum rubrum	A		200
Trichophytum tonsurans	A		200

**Fuente:** (casapia, 2008)

<b>Bacterias Gram positivas</b>	<b>Origen</b>	<b>Cepa</b>	<b>MIC</b>
Bacillus subtilis	NCTC	8236	2
Bacillus megatherium	A		60
Bacillus cereus	A		60
Bacillus cereus var. mycoides	A		60
Clostridium botulinun	NCTC	3805	60
Clostriduim tetani	NCTC	9571	60
Corynebacterium	ATCC	6919	60
Corynebacterium diphtheriae	ATCC	6917	60
Corynebacterium diphtheriae	NCTC	3984	60
Corynebacterium diphtheriae	A		60
Corynebacterium minutissium	ATCC	6501	100
Diplococcus pneumoniae	NCTC	7465	60
Lactobacillus arabinosus	CITM	707	100
Lactobacillus arabinosus	ATCC	8014	66
Lactobacillus casei	CITM	707	100
Listeria monocytogenes	ATCC	15313	20
Mycobacterium tuberculosis	A		2000
Mycobacterium smegmatis	NCTC	8152	20
Mycobacterium phelei	A		6
Sarcina lutea	NCTC	196	60
Sarcina ureae	ATCC	64732	2
Staphylococcus albus	NCTC	7292	2

Staphylococcus albus	C.G.		6
Staphylococcus aureus	NCTC	7447	2
Staphylococcus aureus	NCTC	4163	2
Staphylococcus aureus	NCTC	6571	6
Staphylococcus aureus	NCTC	6966	2
Staphylococcus aureus	ATCC	13709	2
Staphylococcus aureus	ATCC	6538	2
Streptococcus agalactiae	NCTC	8181	60
Streptococcus faecalis	NCTC	8619	200
Streptococcus faecalis	ATCC	10541	60
Streptococcus pyogenes	NCTC	8322	60
Streptococcus viridans			20

**Fuente:** (casapia, 2008)

## Anexo 2: Fotos del proceso de obtención del extracto de la semilla de toronja

1. Recolección de las semillas de toronja



2. Secado de las semillas de toronja



3. Estufa



4. Semillas secas a moler



5. Equipo de molienda



6. Materiales para la maceración



Fuente: Wagner Macías S:

7. Maceración



8. Filtración



8. Equipo de rotavapor



10. Concentración del extracto



11. Extracto concentrado



12. Producto Final



**Anexo 3: Fotos de la toma de muestra microbiológico de los alimentos.**

1. Uvas, Frutillas y Tomates a analizar



2. Lavados de los alimentos con agua potable



3. Hisopado de un antes y después del lavado



4. Alimentos tratados con el EST



5. Producto retirado después de 15 min.



6. Cajas Petri e hisopos.



7. Hisopados de los alimentos ya tratados



8. Siembra de las muestras microbiológicas

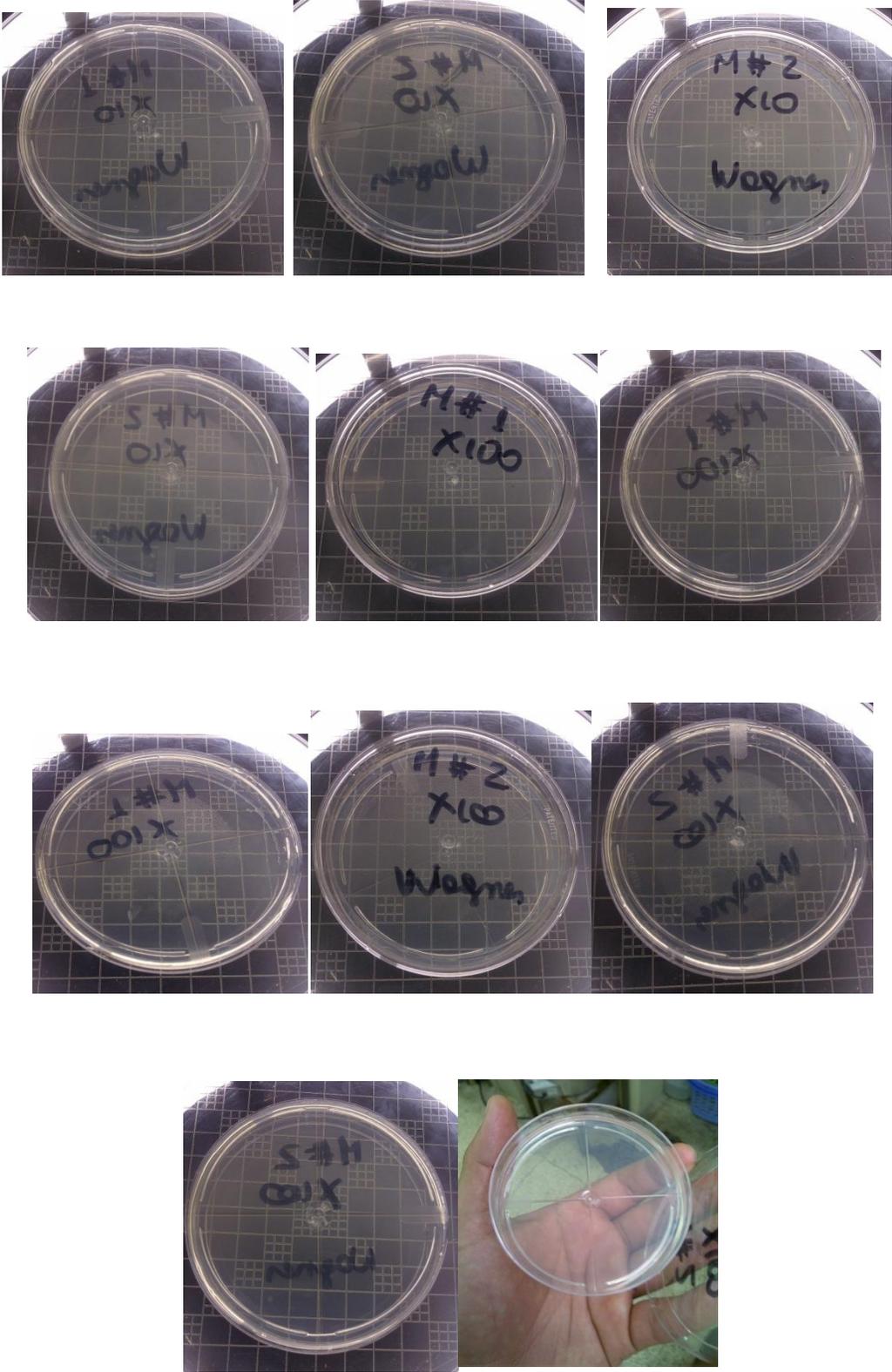


9. Siembra de las muestras microbiológicas y luego incubación

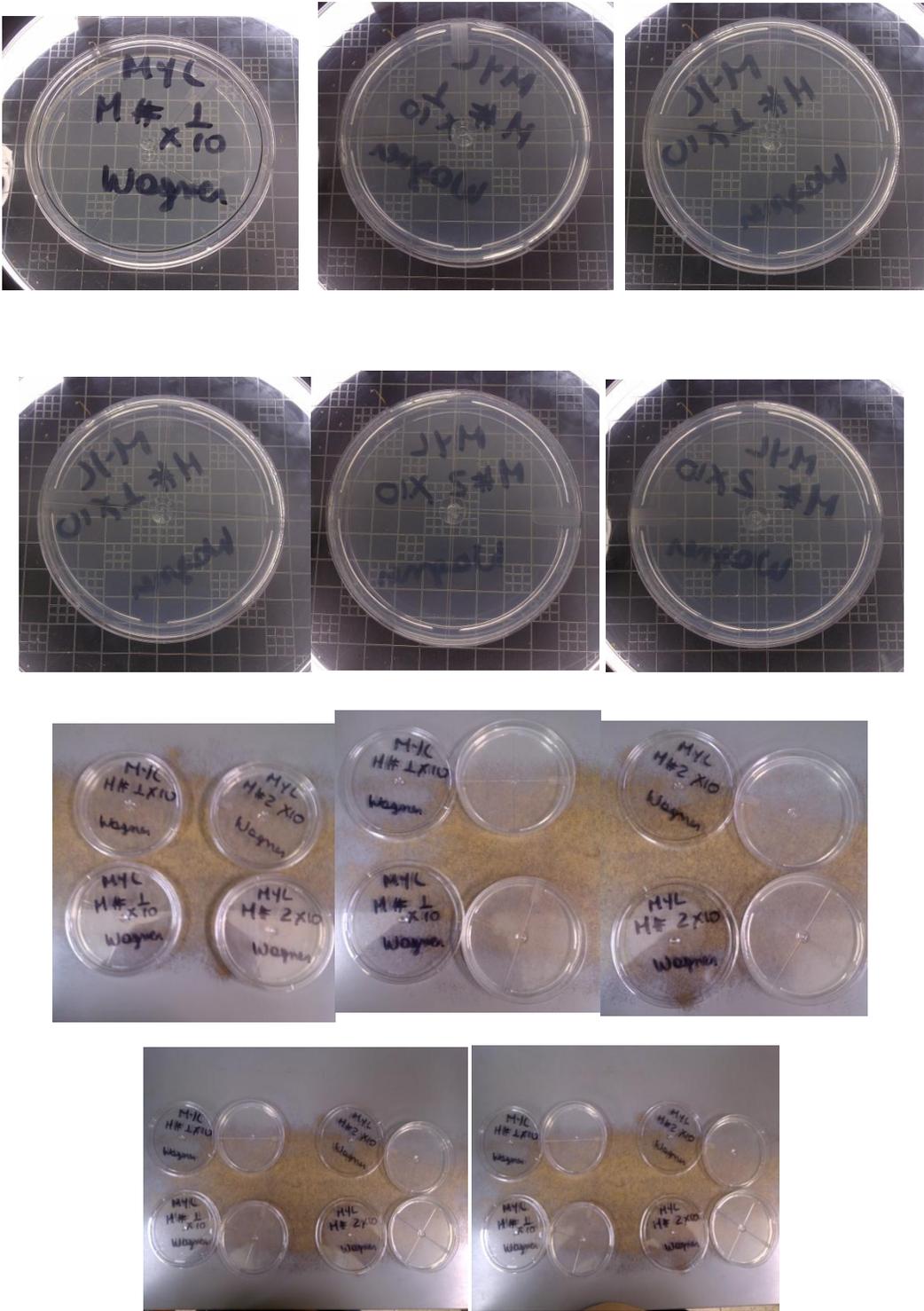


**Fuente:** Wagner Macías S.

**Anexo 4:** Fotos de los análisis microbiológicos de aerobios mesófilos del extracto de la semilla de toronja a concentraciones del 1, 5, 10, 20 y 100 %.



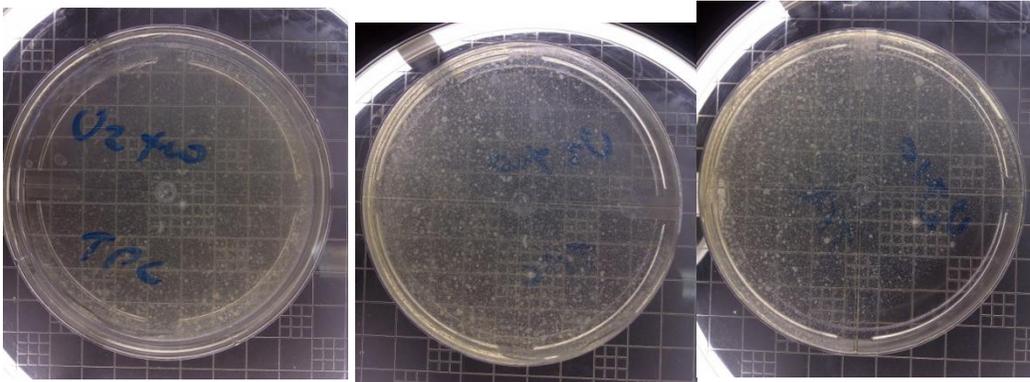
**Anexo 5:** Fotos de los análisis microbiológicos de moho y levaduras del extracto de la semilla de toronja a concentraciones del 1, 5, 10, 20 y 100 %.



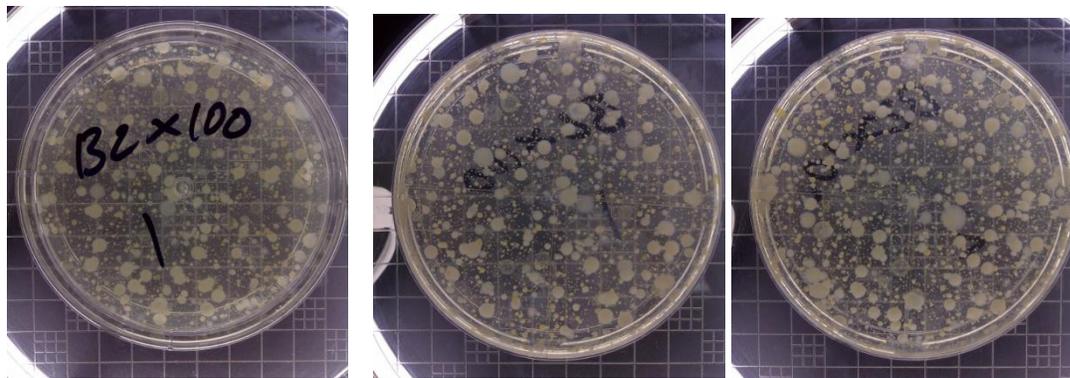
**Fuente:** Wagner Macías S.

**Anexo 6:** Fotos de los análisis microbiológico de aerobios mesófilos de las uvas, frutillas y tomates frescos antes de lavar.

- Análisis microbiológico de la uva fresca sin lavar.



- Análisis microbiológico de la frutilla fresca sin lavar.



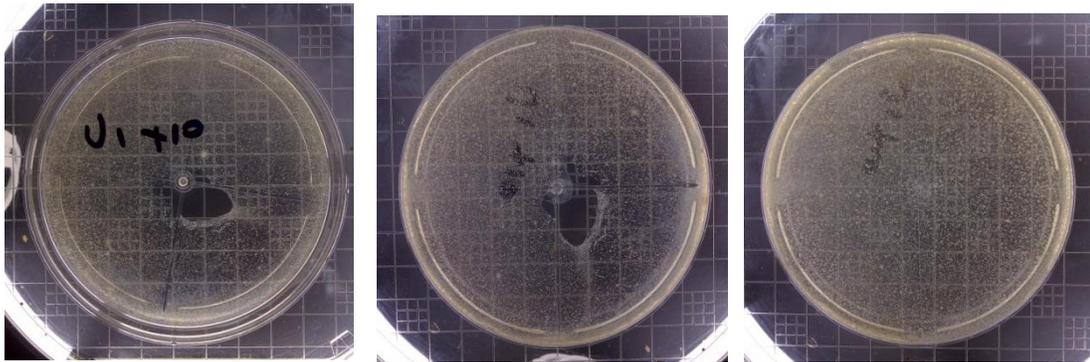
- Análisis microbiológico del tomate fresco sin lavar.



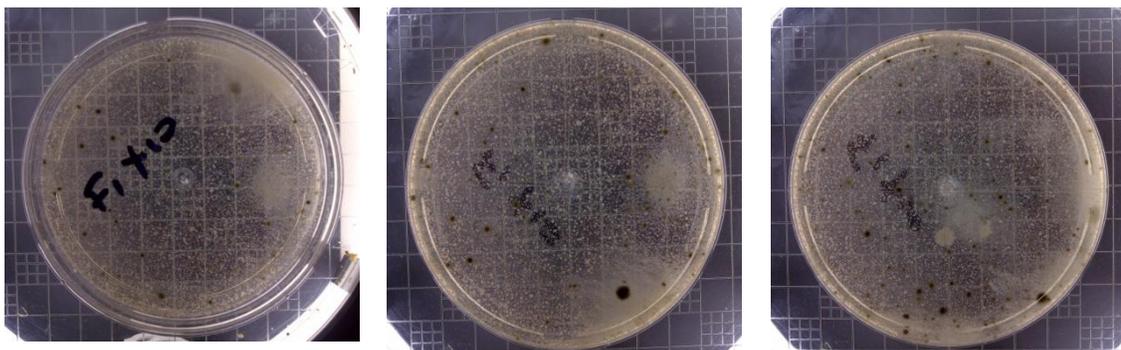
**Fuente:** Wagner Macías S.

**Anexo 7:** Fotos de los análisis microbiológico de moho y levadura de las uvas, frutillas y tomates frescos antes de lavar.

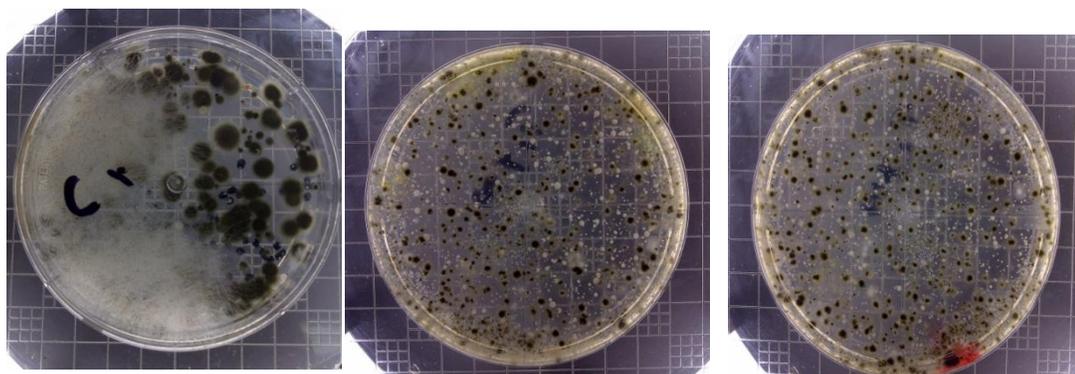
- Análisis microbiológico de la uva fresca sin lavar.



- Análisis microbiológico de la frutilla fresca sin lavar.



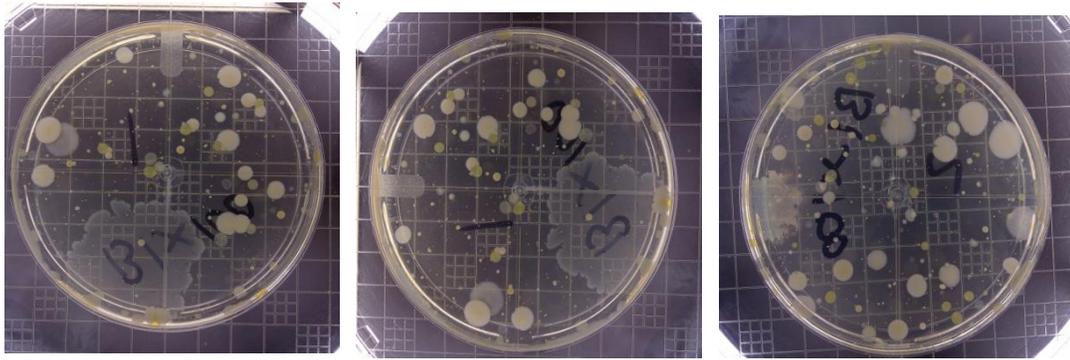
- Análisis microbiológico del tomate fresco sin lavar.



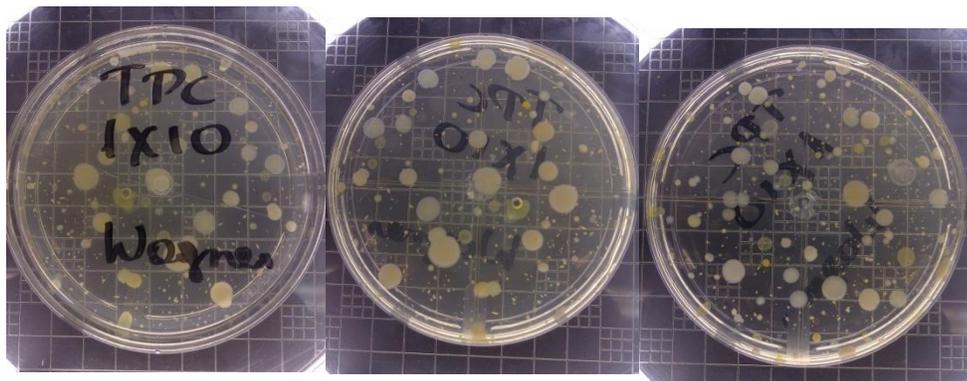
**Fuente:** Wagner Macías S.

**Anexo 8:** Fotos de los análisis microbiológico de aerobios mesófilos de las uvas, frutillas y tomates después de ser lavados con agua potable.

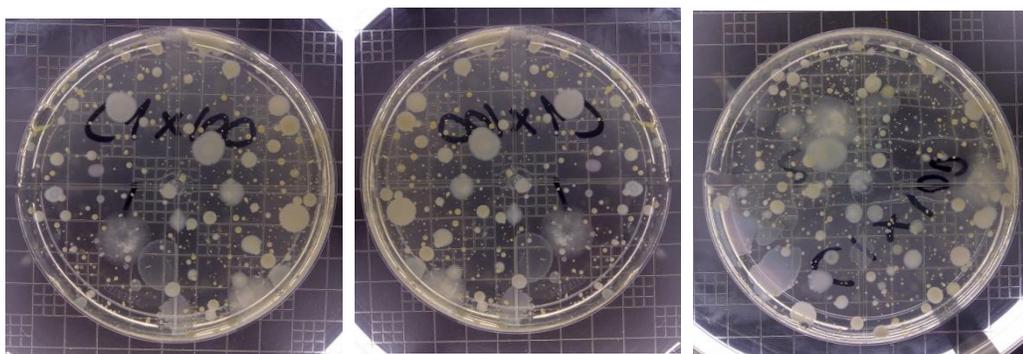
- Análisis microbiológico de la uva lavado con agua potable.



- Análisis microbiológico de la frutilla lavado con agua potable.



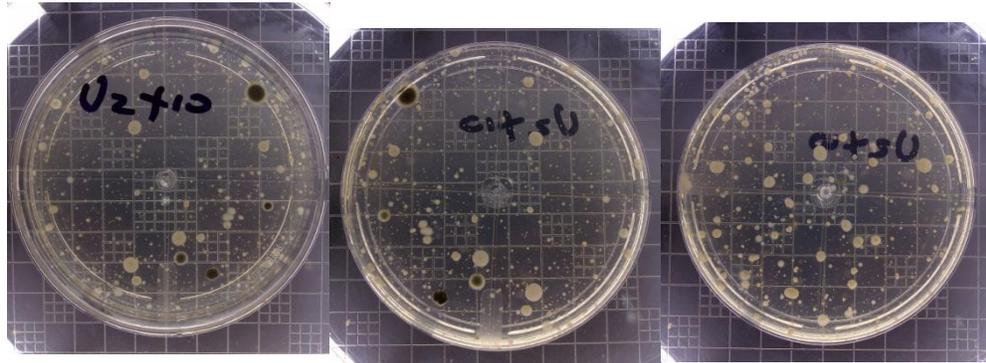
- Análisis microbiológico del tomate lavado con agua potable.



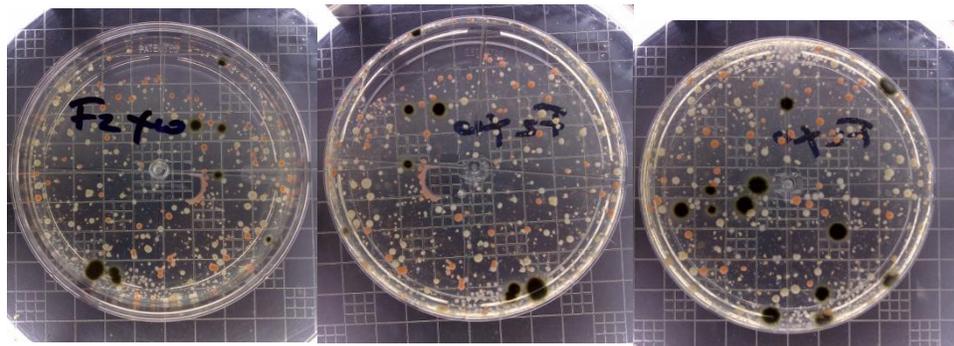
**Fuente:** Wagner Macías S.

**Anexo 9:** Fotos de los análisis microbiológico de moho y levadura de las uvas, frutillas y tomates después de ser lavados con agua potable.

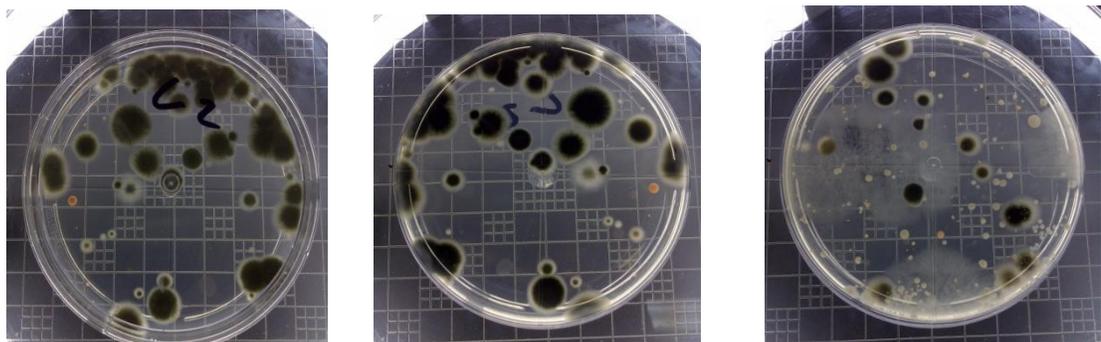
- Análisis microbiológico de la uva lavada con agua potable.



- Análisis microbiológico de la frutilla lavada con agua potable.



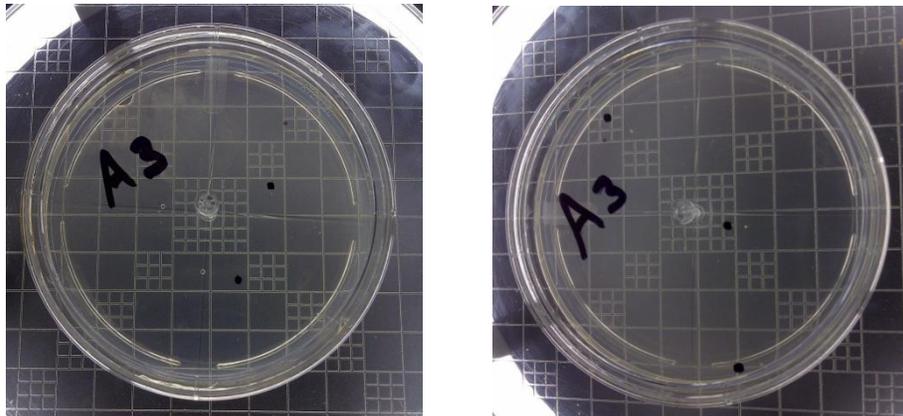
- Análisis microbiológico del tomate lavado con agua potable.



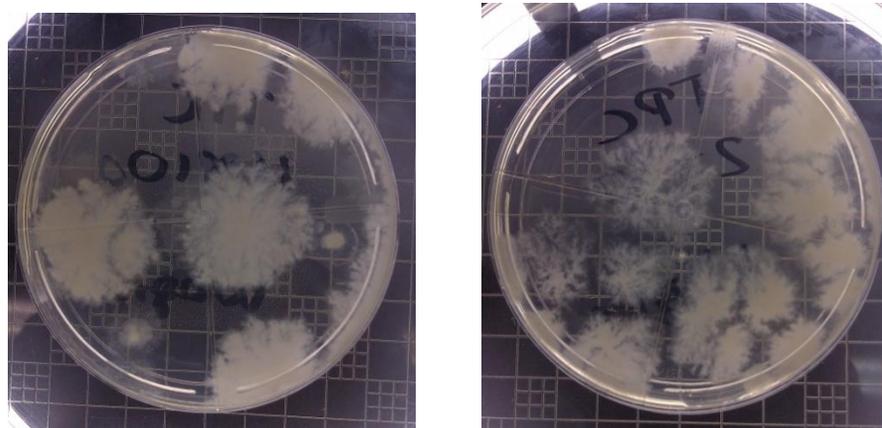
**Fuente:** Wagner Macías S.

**Anexo 10:** Fotos de los análisis microbiológico de aerobios mesófilos de las uvas, frutillas y tomates desinfectados con el extracto de la semilla de la toronja.

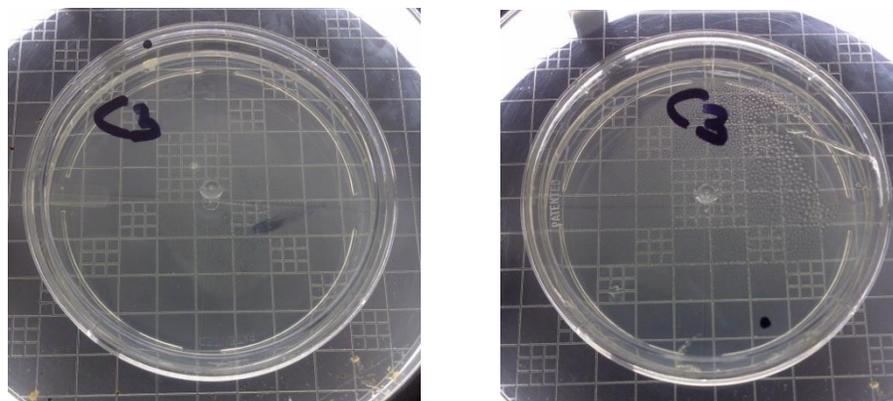
- Análisis microbiológico de la uva desinfectado con el EST.



- Análisis microbiológico de la frutilla desinfectada con el EST.



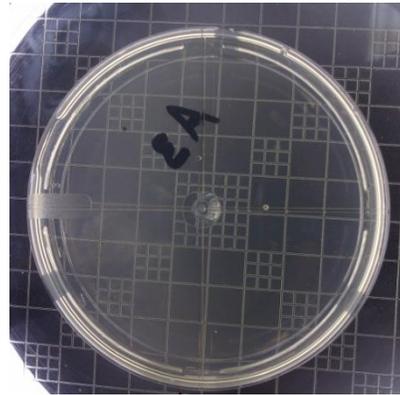
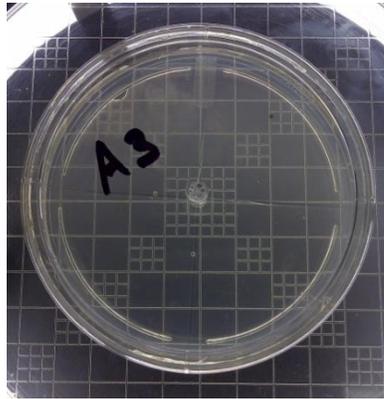
- Análisis microbiológico del tomate desinfectado con el EST.



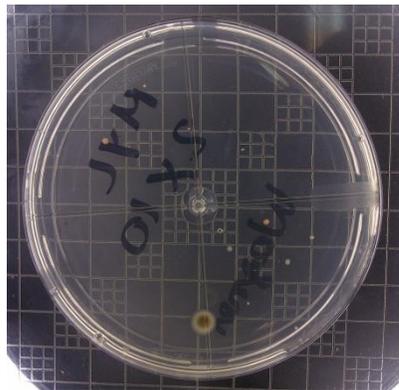
**Fuente:** Wagner Macías S.

**Anexo 11:** Fotos de los análisis microbiológico de moho y levadura de las uvas, frutillas y tomates desinfectados con el extracto de la semilla de toronja.

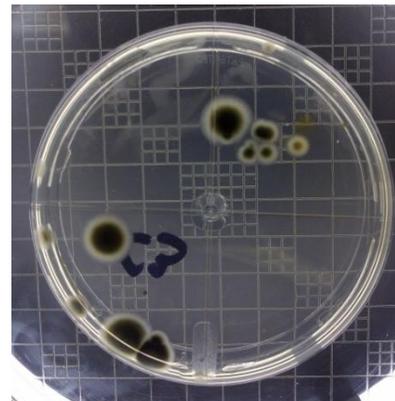
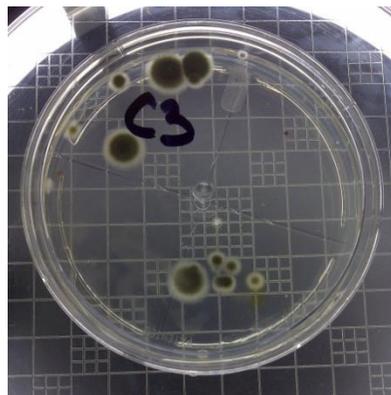
- Análisis microbiológico de la uva desinfectado con el EST.



- Análisis microbiológico de la frutilla desinfectada con el EST.



- Análisis microbiológico del tomate desinfectado con el EST.

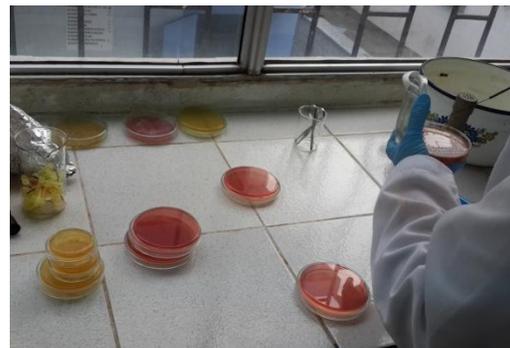
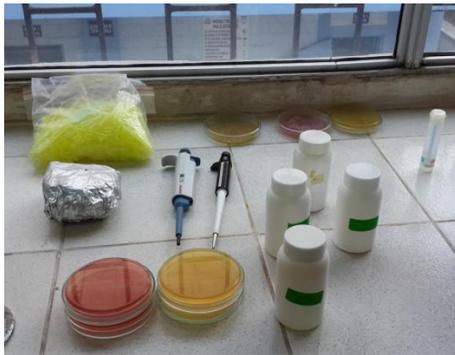


**Anexo 12: Fotos de los análisis de difusión por disco del EST.**

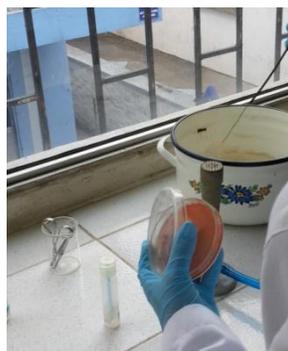
- Discos de papel filtro y cajas con agar Mac Konky y Nutritivo esterilizados.



- Materiales y muestras a utilizar; trasposos de bacterias al agua de peptona.



- Traspaso de bacterias a las nuevas cajas de agar Nutritivo y Mac Konky.



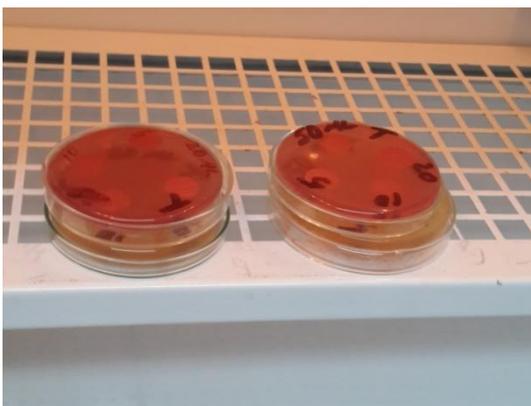
- Adición del EST a distintas concentraciones en los discos de papel filtro.



- Colocación del papel filtro con EST a analizar en sus respectivas cajas



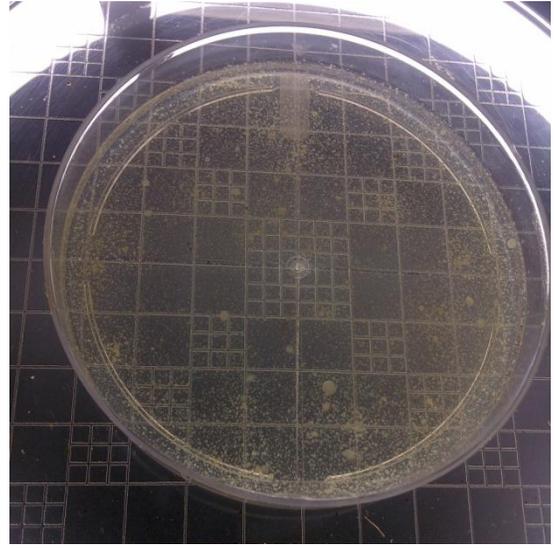
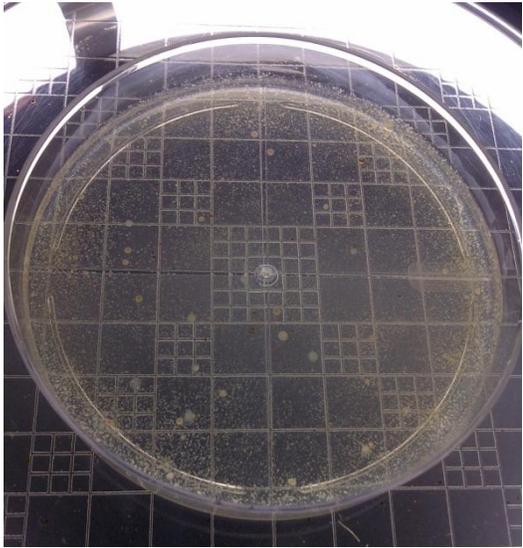
- Colocación de las cajas en incubación por 24 hrs para su respectivo análisis.



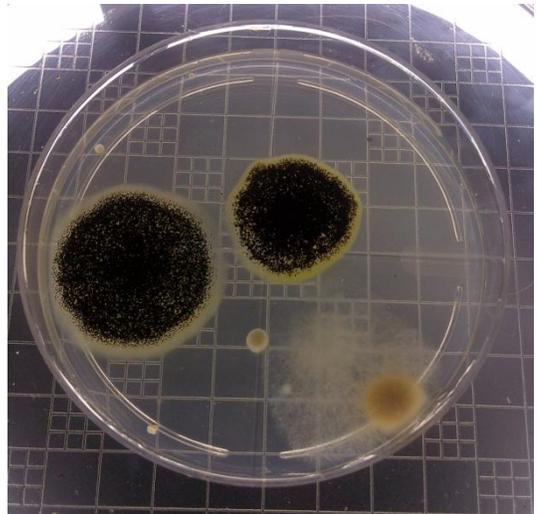
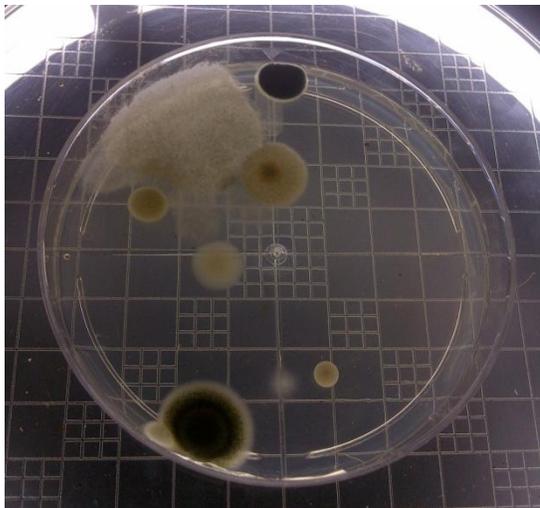
**Fuente:** Wagner Macías S.

**Anexo 13:** Fotos de los análisis microbiológicos del EST por métodos de extracciones no factibles.

- Análisis bacteriológico del EST Obtenido por trituración de la semilla con agua

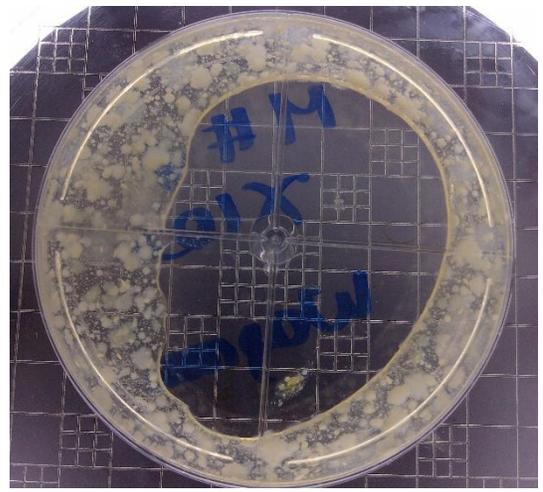
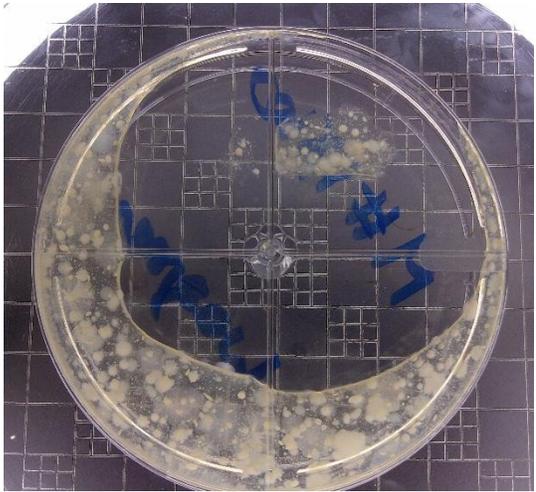


- Análisis de moho y levadura del EST Obtenida por trituración con agua.

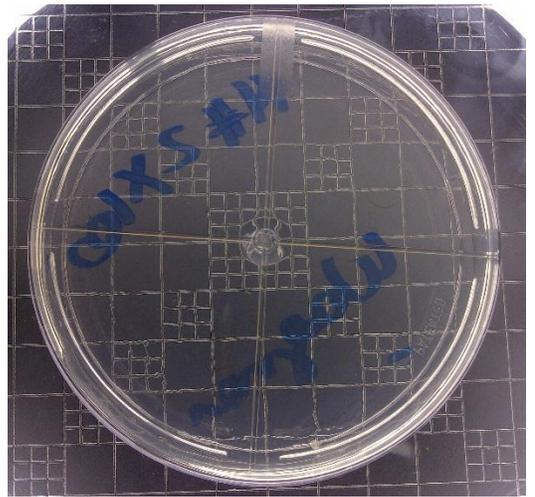
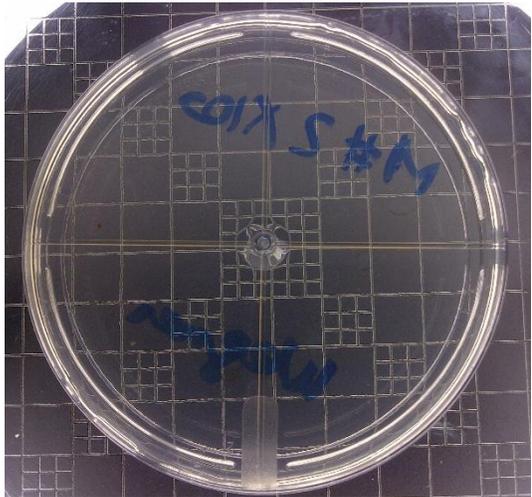


**Fuente:** Wagner Macías S.

- Análisis microbiológico del EST obtenida por extrusión.

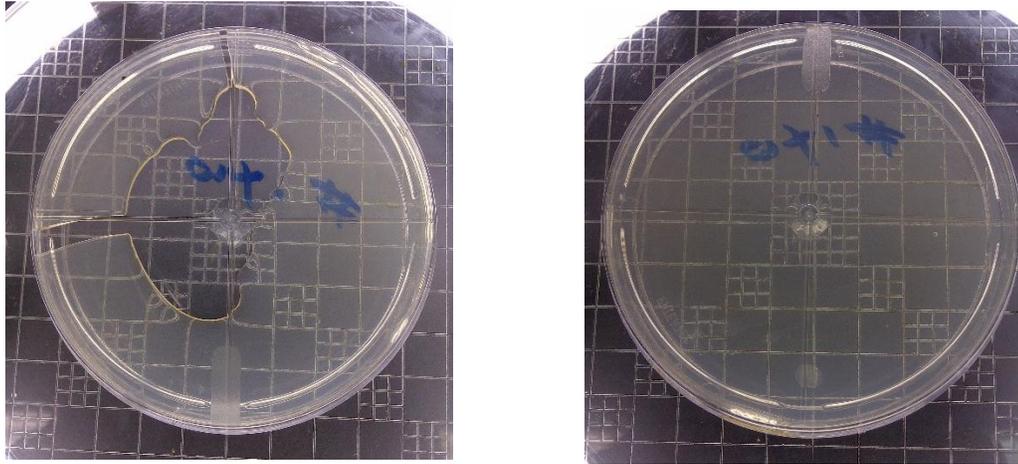


- Análisis del EST obtenida de extracción tras extracción con etanol (estilo BATERIA)

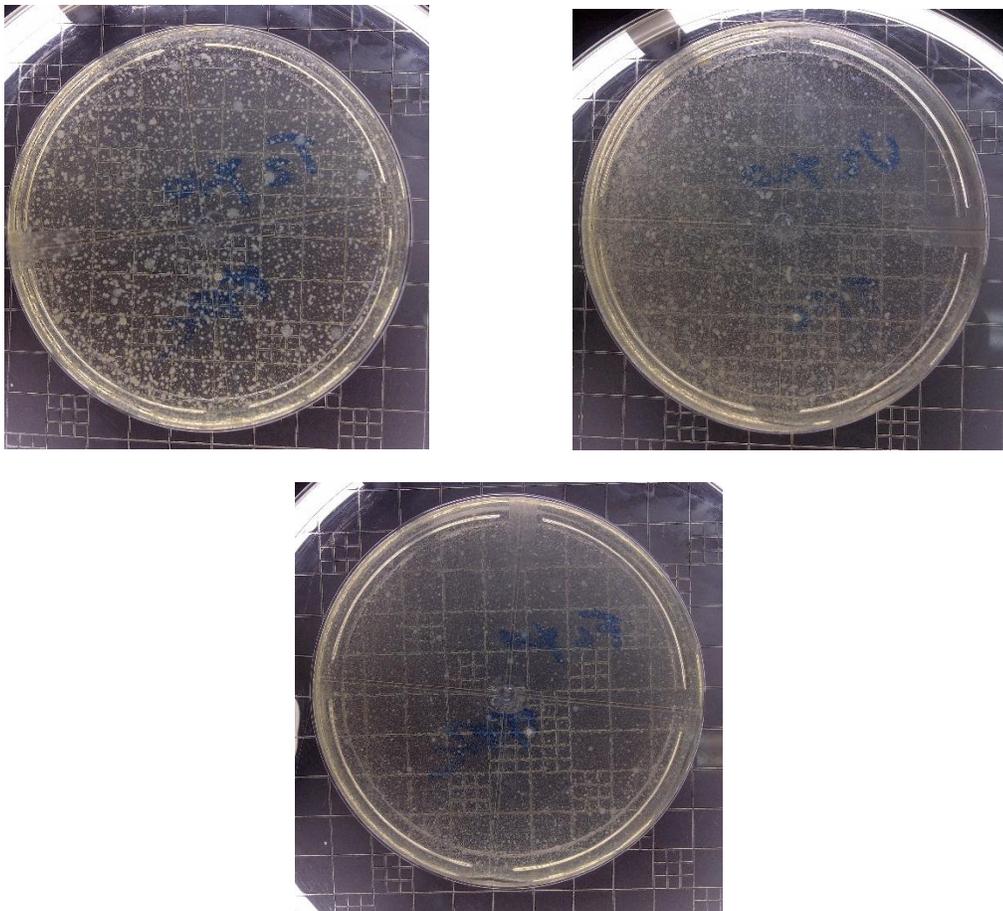


**Fuente:** Wagner Macías S.

- Análisis microbiológico del EST obtenida por extracción con Soxhlet



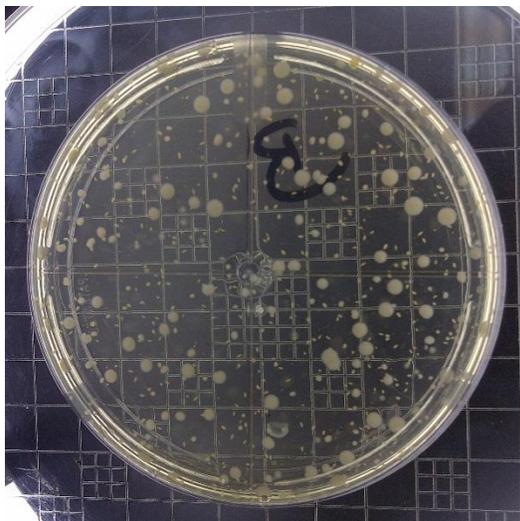
- Análisis del EST obtenida con Soxhlet aplicada en la desinfección de Uvas, Frutillas y tomates



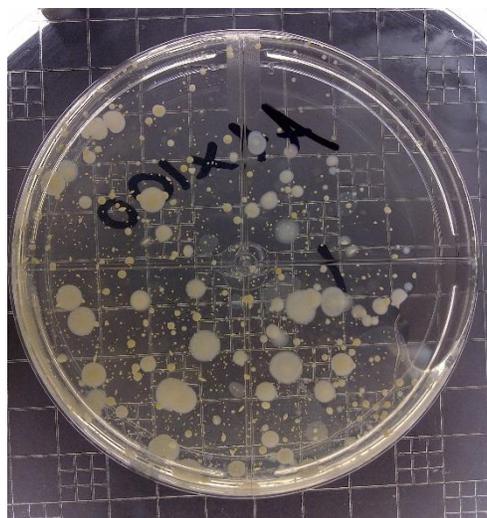
**Fuente:** Wagner Macías S.

**Anexo 14: Análisis comparativo de productos desinfectantes comerciales con el EST**

**Star-Bac Domestic**



**Vitalin**



**EST**



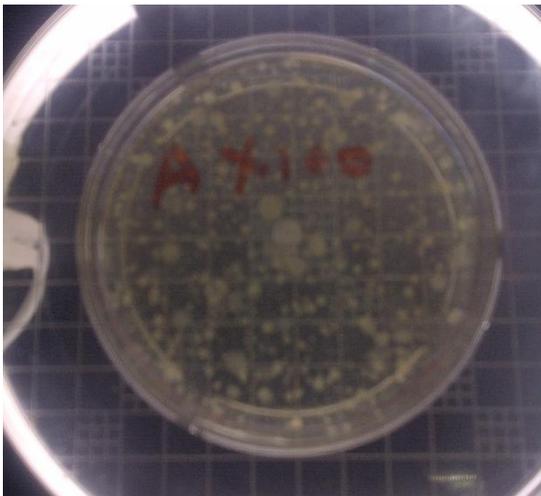
<b>Comparación de productos comerciales con el EST</b>	
<b>Producto desinfectantes</b>	<b>UFC/cm2 de Bacterias en frutillas</b>
Star-Bac Domestic	54000
Vitalin	134800
EST	1400

**Fuente:** Wagner Macías S.

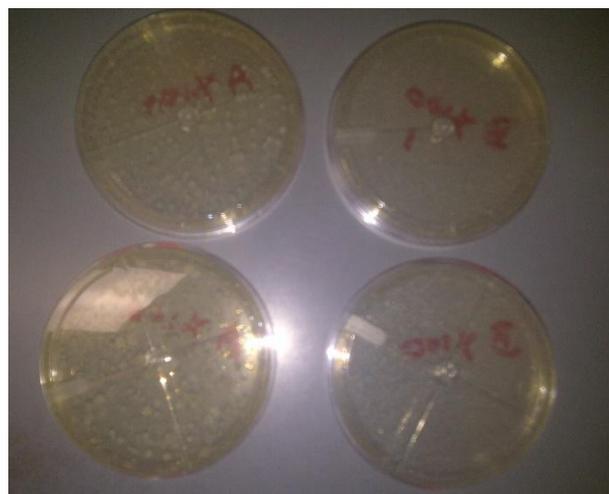
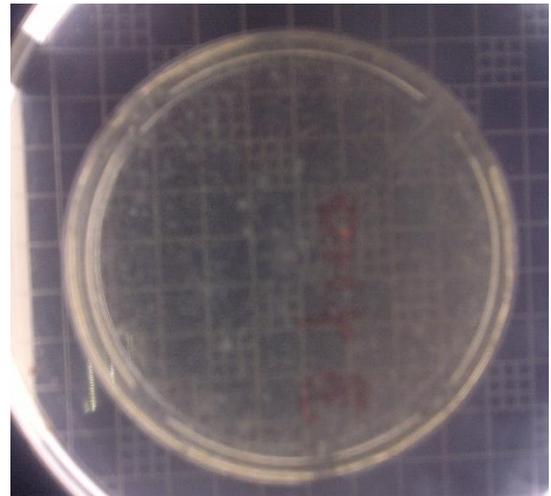
**Anexo 15:** Fotos de análisis microbiológico de las frutillas desinfectadas con etanol a 98° al 1 y 10% de dilución.

- Análisis de aerobios mesófilos

Al 1% de dilución

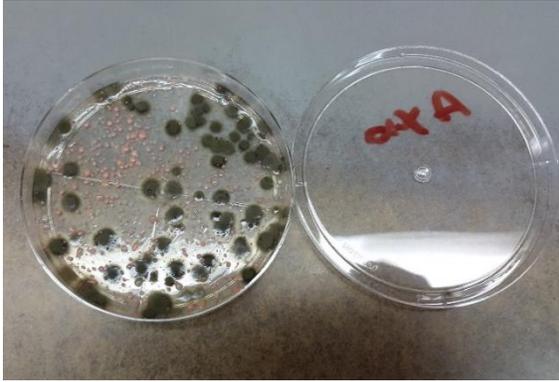


Al 10% de dilución

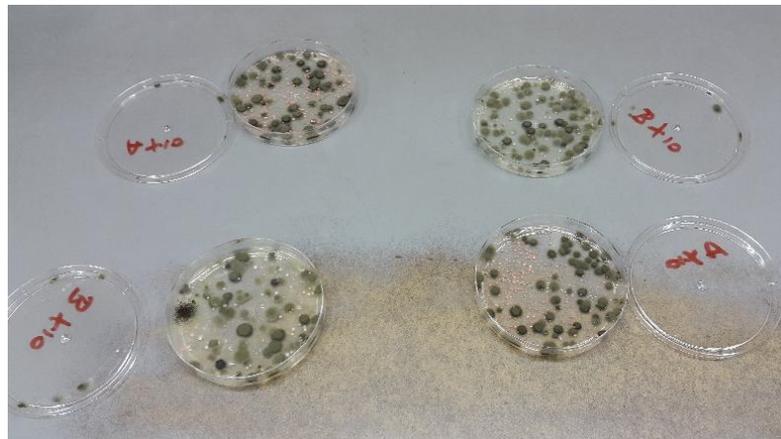
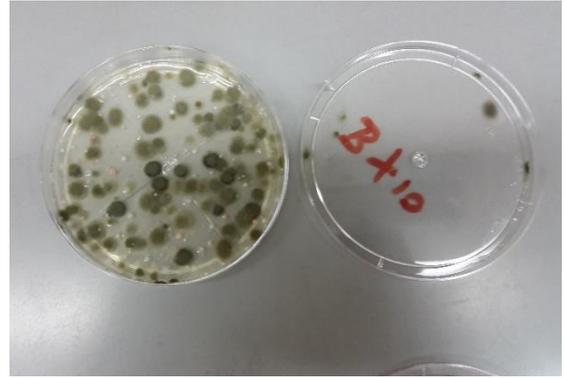


- Análisis de moho y levadura

Al 1% de dilución



Al 10% de dilución



## **Anexo 16: DIFERENTES TIPOS DE DESINFECCIÓN**

### **Tratamiento térmico:**

Los tratamientos térmicos incluyen el curado e inmersión en agua caliente.

#### **Curado**

El curado es un tratamiento térmico en el cual el producto es sometido a temperaturas y humedades relativas altas durante varios días. La aplicación de este tratamiento ayuda a disminuir la aparición de algunas enfermedades.

#### **Inmersión en agua caliente**

El tratamiento térmico por inmersión en agua caliente es otro método físico utilizado para lograr una sanitización superficial en vegetales. En general se trata de proceso cortos en los que los productos son tratados con agua caliente a temperaturas entre 50-70°C, dependiendo del producto a tratar. (Davis, 06/1999)

### **Agentes desinfectantes**

Dentro de los agentes desinfectantes utilizados para tratar frutas y hortalizas se encuentran: compuestos halogenados, ácidos, amonio cuaternarios y compuestos de activo. (Gabriela Garmendia, 1991)

### **Compuestos clorados**

#### **Cloro, sales de hipoclorito y dióxido de cloro**

El cloro es el desinfectante más utilizado en la industria alimentaria. Debido a su bajo costo, se ha utilizado ampliamente para desinfección de superficies en contacto con alimentos y también para reducir la carga microbiana del agua utilizada en diferentes operaciones. En general se utilizan soluciones acuosas de hipocloritos o de cloro gas. Cuando el cloro se disuelve en agua se forma ácido hipocloroso y ácido clorhídrico estableciéndose un equilibrio entre las distintas sustancias (1).



A su vez el ácido hipocloroso (2) está en equilibrio con su forma disociada. Es así que las soluciones de cloro contienen moléculas de HOCl (ácido hipocloroso) y sus iones  $H^+$  y  $OCl^-$  en equilibrio. De ellos, la forma no disociada del ácido (HOCl) es la forma activa frente a los microorganismos. Cuando se disuelve hipoclorito en agua la reacción que ocurre es la (2) a la inversa, es decir el ión hipoclorito formado en la disolución de la sal forma ácido hipocloroso, estableciéndose el mismo equilibrio. (Gabriela Garmendia, 1991)

El equilibrio entre estas sustancias químicas depende del pH. Al descender el pH, el equilibrio (2) se desplaza hacia la forma no disociada, o sea el ácido hipocloroso predomina por lo que la acción antimicrobiana es mayor. Los porcentajes de ácido hipocloroso a pH 6 y 8 son de 97 y 23% respectivamente. Sin embargo a pH más bajos el equilibrio de la reacción (1) se desplaza a la formación de cloro gas el cual se libera pudiendo producir intoxicaciones en los aplicadores. Por lo tanto, el pH es un factor de suma importancia a tener en cuenta en las soluciones de cloro. Utilizando soluciones de pH 6 se logra conseguir alta efectividad y estabilidad.

El modo de acción del ácido hipocloroso se basa en su capacidad oxidante. Es altamente reactivo en presencia de materia orgánica, reaccionando con muchos grupos funcionales oxidándolos. Su capacidad de destruir microorganismo depende de la cantidad de cloro residual libre, es decir el ácido hipocloroso restante después de reaccionar con materia orgánica presente en el agua. Como resultado de reacción con la materia orgánica, el ácido hipocloroso forma cloro gas pero también trihalmetanos como el cloroformo de posible acción cancerígena. Es por eso que existe preocupación de cloro por tiempos prolongados puede causar irritación en la piel y el tracto respiratorio. Según la administración de Salud Ocupacional de EEUU (OSHA) el límite de exposición para trabajadores es de 1ppm en aire y se recomienda no más de 0.5ppm en aire en jornadas de 10 horas durante semanas de trabajo de 40 horas

(OSHA). A su vez, la posible formación de compuestos órgano clorados durante el tratamiento de frutas y hortalizas con cloro también es un peligro potencial para estos operarios. (Gabriela Garmendia, 1991)

### **Dióxido de cloro**

Su eficiencia depende mucho menos del pH y el contenido de materia orgánica que la acción de ácido hipocloroso o del cloro. Presenta un gran poder oxidante, incluso mayor al del cloro. Sin embargo es altamente inestable, se descompone a temperaturas superiores a los 30°C y al ser expuesto a la luz. Debe tenerse en cuenta que el dióxido de cloro a concentraciones por encima de 10% es explosivo, por lo que debido a esto y a su alta reactividad no puede ser trasladado en forma concentrada. En general se utilizan generadores in situ. Los principales productos de reacción frente a la materia orgánica son cloritos y cloratos, no formándose trihalometanos como en el caso del ácido hipocloroso (Gabriela Garmendia, 1991)

El uso de dióxido de cloro como agente desinfectante de frutas y hortalizas no está tan estudiado como el uso del hipoclorito. En general las concentraciones efectivas de dióxido de cloro son bastante menores que las correspondientes de hipoclorito.

Según FDA (2001) las concentraciones no deben superar los 5 ppm para el tratamiento de frutas y hortalizas sin pelar. A su vez, el límite de exposición de trabajadores en EEUU es de 0.1 ppm en aire según OSHA:

Algunas formulaciones comerciales contienen lo que se conoce como “dióxido de cloro estabilizado”. En realidad se trata de soluciones de clorito de sodio buffereadas con bicarbonato o fosfatos, los cuales manteniendo un pH alto estabilizan el clorito de sodio. El poder oxidante del clorito de sodio es mucho menor que el del dióxido de cloro y por lo tanto se acción antimicrobiana también es mucho menor. Sin embargo, llevando la solución a pH ácido, se forma dióxido de cloro a partir del clorito en solución. El uso del clorito acidificado, en concentraciones entre 500 y 1200 ppm, ha sido aprobado como sanitizantes de frutas y verduras por la FDA de Estados Unidos (Parish et al., 2003). Se

aprueba su uso en conjunto con ácidos reconocidos como seguros (GRAS), tanto para baño como para aplicación por aspersión (CFR, 2000).

### **Compuestos amónicos cuaternarios (Quats)**

Son surfactantes catiónicos utilizados para la desinfección de paredes, suelos, equipos y superficies en contactos con los alimentos en las plantas de procesamientos de frutas y hortalizas. En los casos de alimentos la FDA no aprueba su uso, a menos que el producto sea pelado antes de su consumo (FDA, 2001).

Presentan algunas ventajas sobre otros desinfectantes, ya que no son corrosivos y son estables a altas temperaturas. Sin embargo su espectro de acción antimicrobiana es menor que los sanitizantes clorados. Son muy eficaces frente hongos, levaduras y bacterias Gram positivas como *L. monocytogenes*, mientras que su acción es menor frente a bacterias Gram negativas como coliformes o *Salmonella ssp.* Sin embargo, debe de tenerse en cuenta que la actividad antimicrobiana varía según el amonio cuaternario utilizado (Marriott, 1999). El modo de acción antimicrobiana se puede resumir en una adsorción de compuesto a la superficie microbiana, una posterior difusión al interior de la célula, unión a la membrana citoplasmática y ruptura de la misma con liberación de contenido citoplasmático (Merianos, 1991). Debido a su actividad surfactante, tiene buena capacidad penetrante y pueden formar films antimicrobianos sobre la superficie del producto. No se descompone en su acción frente a microorganismo, dejando residuos sobre el producto aplicado (Parish et al., 2003).

Son relativamente estables en presencia de materia orgánica. El rango de pH óptimo para acción antimicrobiana, es de 6-10. No son compatibles con detergentes aniónicos.

### **Compuestos ácidos**

Los ácidos orgánicos son muy utilizados para prevenir el desarrollo microbiano en alimentos. Su uso se basa en lograr un bajo pH que impida la proliferación de microorganismos no deseados. Sin embargo también tiene acción antimicrobiana por sí mismo. En este sentido son activos a pH ácidos, en su forma no ionizada. En esta

forma el ácido pasa a través de la membrana celular llegando al citoplasma. Debido a que el pH intracelular es cercano a la neutralidad, el ácido se disocia dentro de la célula, acidificando el interior celular causando efectos inhibidores de reacciones enzimáticas y sistemas de transporte (Foegeding, y Busta, 1991).

Se han utilizado también como desinfectantes sobre alimentos. La eficiencia de los ácidos orgánicos como desinfectantes varía con el tipo de ácido y el microorganismo que se busca inhibir. Su aplicación puede tener efectos negativos en propiedades sensoriales como el sabor y el aroma de los productos.

## **Compuestos de oxígeno activo**

### **Peróxido de hidrógeno**

El peróxido de hidrógeno es un fuerte oxidante. Los productos de reacción con materia orgánica son oxígeno y agua, los cuales son totalmente inocuos. Su actividad antimicrobiana está basada en su poder oxidante. De esta forma reacciona con grupos sulfhidrilo y dobles enlaces en proteínas, lípidos y afectando por lo tanto la membrana citoplasmática. Puede además incluir la formación de radicales libres que actúan contra ADN, lípidos de membrana y otros componentes celulares esenciales (Block, 1991).

El uso de los compuestos del oxígeno activo, el uso del peróxido de hidrógeno como agente desinfectante está limitado a algunas frutas y hortalizas. No es aconsejable su uso sobre fresas y frambuesas, debido al blanqueamiento de pigmento, también produce efecto negativo en hongos comestibles debido a la oxidación de los compuestos fenólicos ocasiona pérdida de color. (Sapers, 2001).

### **Ácido peracético**

El ácido peracético es un fuerte agente oxidante. Comercialmente se consigue como una mezcla de ácido peracético, ácido acético y peróxido de hidrógeno.

Los productos de reacción con materia orgánica son ácido acético y oxígeno, lo cuales no son tóxicos. Su actividad depende del pH, siendo más activo a pHs más bajos. Sin embargo su actividad se mantiene en un amplio rango de pH, disminuyendo en forma importante por encima de pH = 9. Su acción antimicrobiana se basa en su capacidad oxidante. Se plantea que los grupos sulfhídricos en proteínas, enzimas y otros metabolitos son oxidados. De esta forma se pierde la funcionalidad de muchas de estas macromoléculas, lo cual trae como consecuencia la ruptura celular por pérdida de funcionalidad de la membrana citoplasmática.

La FDA (2001) aprueba su uso para la desinfección directa de frutas y hortalizas. La contaminación recomendada es de 40-80 ppm.

### **Ozono**

El ozono es un gas a temperatura ambiente, con una muy elevada capacidad oxidativa. Su poder oxidante es mayor al del hipoclorito y del dióxido de cloro. Es poco soluble en agua lográndose soluciones de hasta 10 µg/ml. Sin embargo en soluciones por encima de 1 µg/ml se libera ozono al aire por encima de los niveles de seguridad dados por OSHA (máxima concentración en lugar de trabajo = 0.1 ppm). Al reaccionar se descompone en oxígeno sin dejar otro tipo de residuos (Smilanick et al., 1999).