

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**"ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE
CÁSCARA DE NARANJA (*Citrus aurantium* L.) FRENTE AL
HONGO *Fusarium semitectum*"**

TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERA AGROINDUSTRIAL

PRESENTADO POR:
Bach. Karina Yeny GÓMEZ CISNEROS

AYACUCHO – PERÚ

2014

DEDICATORIA

*A Dios, por resplandecer,
bendecir mi camino y
realizar mis deseos.*

*A mis padres Maximiliana
y Antonio, por todo su
apoyo incondicional que
siempre me brindaron.*

*A mi hermano Erick Yoel,
que me ilumina y protege
del cielo.*

*A mis hermanitas, por ser
fuente de inspiración y
continuidad en mi vida.*

AGRADECIMIENTO

A Dios, por todo lo que me ha brindado, por resplandecer mi camino siempre y acompañarme en todo momento.

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, alma máter, forjadora de profesionales competentes y de calidad humana, al servicio de la sociedad.

A la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia y a la Escuela de Formación Profesional de Ingeniería Agroindustrial por acogerme y brindarme una carrera profesional.

A los docentes de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia y de la Escuela de Formación Profesional de Ingeniería Agroindustrial, por los conocimientos impartidos y sabios consejos durante mi formación académica profesional.

Al Ing. Mg. Agustín Julián Portugal Maurtua docente de la EFP de Ingeniería Agroindustrial de la UNSCH, asesor del presente trabajo de investigación, por su apoyo y colaboración en el desarrollo del presente trabajo de investigación, materializado en este informe.

Un agradecimiento particular a todas las personas que me apoyaron y colaboraron para llevarse a cabo el desarrollo de mi trabajo de investigación.

ÍNDICE

RESUMEN	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 ANTECEDENTES	4
2.2 Aspectos botánicos de la planta	5
2.2.1 Descripción taxonómica de la naranja (<i>Citrus aurantium</i> L.)	5
2.2.2 Descripción botánica de la naranja (<i>Citrus aurantium</i> L.)	6
2.2.3 Distribución geográfica de (<i>Citrus aurantium</i> L.)	6
2.3 AGENTES ANTIMICROBIANOS	7
2.3.1 Modo general de acción de los agentes antimicrobianos	7
2.3.2 Antimicrobianos naturales	8
2.4 ACEITES ESENCIALES	9
2.4.1 Propiedades físicas y organolépticas de los aceites esenciales	10
2.4.2 Composición de los aceites esenciales	10
2.4.3 Usos medicinales	12
2.4.4 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	13
2.4.5 Extracción de aceites esenciales	14
2.4.5.1 Extracción por destilación con arrastre de vapor	15
2.5 UBICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Fusarium semitectum</i>	16
2.5.1 Morfología	16
2.5.2 Cultivo e identificación de los hongos	17
2.5.2.1 Medio de cultivo	17
2.5.2.2 Identificación de <i>Fusarium semitectum</i>	18
2.5.3 Patología y patogenia	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN	20
3.2 MATERIA PRIMA	20
3.1 MICROORGANISMO DE ENSAYO	20
3.2 MATERIALES, INSUMOS, REACTIVOS Y EQUIPOS	21
3.4.1 Materiales	21
3.4.2 Insumos	22
3.4.3 Reactivos	22
3.4.4 Equipos	22
3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	23
3.5.1 Procedimiento para la recolección de la muestra	23
3.5.2 Extracción del aceite esencial mediante el flujo de procedimiento	23
3.5.3 Determinación de características organolépticas y fisicoquímicas	27
3.5.4 Preparación del medio de cultivo	30
3.5.5 Preparación Escala Mc Farland	31
3.5.6 Preparación de las diluciones de la muestra	31
3.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	31
3.6.1 Preparación de <i>Fusarium semitectum</i> 12pfs	31
3.6.2 Preparación del inóculo o suspensión	32

3.6.3 Determinación del halo de inhibición	32
3.6.4 Determinación de la concentración óptima antifúngica	33
3.6.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	33
3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL	34
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
IV.RESULTADOS Y DISCUSIONES	37
V.CONCLUSIONES	48
VI.RECOMENDACIONES	49
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	55

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Composición química del aceite esencial de naranja	12
Tabla 2	Concentraciones decrecientes de las diluciones del aceite esencial	33
Tabla 3	Variables de extracción del aceite esencial de cáscara de Naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	38
Tabla 4	Análisis de varianza para los halos de inhibición	39
Tabla 5	Prueba de Tukey para los halos de inhibición	39
Tabla 6	Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición	43
Tabla 7	Prueba de Tukey para los porcentajes de inhibición	43
Tabla 8	Resultado de las diluciones de la Concentración Mínima Inhibitoria CMI)	44
Tabla 9	Características organolépticas del aceite esencial de la cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	59
Tabla 10	Constantes fisicoquímicas del aceite esencial de la cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	60
Tabla 11	Datos descriptivos de los halos de inhibición del efecto antifúngico del aceite esencial de cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	72
Tabla 12	Datos descriptivos de los porcentajes de inhibición del efecto antifúngico del aceite esencial de cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	73

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Planta de la naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	6
Figura 2	Estructura química de los componentes del aceite esencial de cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	12
Figura 3	Diagrama de flujo para la obtención de aceite esencial de cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	24
Figura 4	Balance de materia para la obtención del aceite esencial de cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	24
Figura 5	Promedio de los halos de inhibición por efecto del aceite esencial de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	38
Figura 6	Porcentaje de inhibición del aceite esencial de la cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	42
Figura 7	Cepa conservada de <i>Fusarium semitectum 12pfs</i>	56
Figura 8	Frutos recolectados de (<i>Citrus aurantium L.</i>)	57
Figura 9	Troceado de la cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	57
Figura 10	Procedimiento de extracción del aceite esencial	58
Figura 11	Obtención del aceite esencial de cáscara de naranja	58
Figura 12	Preparación y esterilización de materiales y medios de cultivo	62
Figura 13	Preparación de medios de cultivo de APD y CPD	63
Figura 14	Esquema de siembra del método de difusión en pocillo	64
Figura 15	Preparación de las diferentes concentraciones del aceite esencial de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>) y procedimiento de siembra	65
Figura 16	Halos de inhibición de las concentraciones de 1%,2%,4% y 8%	66
Figura 17	Halos de crecimiento del hongo <i>Fusarium semitectum12pfs</i> usado en el control	67
Figura 18	Protocolo para la determinación de la CMI	68
Figura 19	Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	69
Figura 20	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria CMI	70
Figura 21	Crecimiento de <i>Fusarium semitectum12pfs</i> usado en la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	71

ÍNDICE DE ANEXOS

		Página
Anexo 1	Cepa conservada de <i>Fusarium semitectum</i> 12pfs	56
Anexo 2	Frutos recolectados y troceado de la cáscara de naranja	57
Anexo 3	Procedimiento de extracción y obtención del aceite esencial de cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	58
Anexo 4	Características organolépticas del aceite esencial de cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	59
Anexo 5	Constantes fisicoquímicas del aceite esencial de cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>)	60
Anexo 6	Cálculo del rendimiento del aceite esencial	61
Anexo 7	Preparación y esterilización de materiales y medios de cultivo	62
Anexo 8	Preparación de medios de cultivo de APD y CPD	63
Anexo 9	Esquema de siembra del método de difusión en pocillo	64
Anexo 10	Preparación de las diferentes concentraciones del aceite esencial de cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>) y procedimiento de siembra	65
Anexo 11	Halos de inhibición de las concentraciones 1%,2%,4% y 8%	66
Anexo 12	Halos de crecimiento del hongo <i>Fusarium semitectum</i> 12pfs usado en el control	67
Anexo 13	Protocolo para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	68
Anexo 14	Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	69
Anexo 15	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	70
Anexo 16	Crecimiento de <i>Fusarium semitectum</i> 12 pfs del control usado en la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	71
Anexo 17	Datos descriptivos de los halos de inhibición del efecto antifúngico del aceite esencial	72
Anexo 18	Datos descriptivos de los porcentajes de inhibición del efecto antifúngico del aceite esencial	73
Anexo 19	Matriz de consistencia	74

Actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*) frente al hongo *Fusarium semitectum*.

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de "naranja" *Citrus aurantium L.* frente a la cepa de *Fusarium semitectum*, se desarrolló el presente trabajo de investigación en los laboratorios de Procesos Agroindustriales, Transferencia de Masa de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia y en el Laboratorio de Microbiología de La Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de Enero a Junio del 2014. Los frutos fueron recolectados de un puesto de frutas del mercado Nery García Zárate (lugar donde son expendidas) de la provincia de Huamanga. El tipo de investigación fue experimental y la actividad antifúngica del aceite esencial a concentraciones de 1%, 2%, 4% y 8%, se determinó según la metodología de Lozina y col. (2005) y Gimferrer (2008) en *Fusarium semitectum* 12pfs, previamente utilizando un control.

El aceite esencial al 8%, presentó mayor actividad antifúngica, respecto a las demás concentraciones, con halo de inhibición de 0,61mm; inferior al control utilizado, al cual no se le incorporó nada de aceite esencial y presentó 11,22mm, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Los porcentajes de inhibición de las concentraciones del 1%, 2% y 4% respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria presentaron diferente actividad antifúngica, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$). La CMI del aceite esencial fue 0,706 g/ml.

Palabras claves: *Citrus aurantium L.*, naranja, *Fusarium semitectum* 12pfs, actividad antifúngica.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha observado un incremento de la demanda por consumo de alimentos con poca cantidad de aditivos y consumir alimentos más naturales, por ello se busca encontrar compuestos alternativos y naturales para su uso como aditivo alimentario, para poder satisfacer la demanda del consumidor y ofrecer alimentos naturales para su consumo.

El control del crecimiento microbiano es uno de los factores que se deben considerar para la conservación de alimentos, por lo que la sustitución de los agentes antimicrobianos químicos por sustancias naturales que no alteren las características sensoriales y nutricionales de los alimentos se hace cada vez más preferencial.

Se sabe que los aceites esenciales extraídos de diferentes frutos cítricos y plantas aromáticas, poseen compuestos que exhiben distintos niveles de actividad antimicrobiana, además de ser altamente volátiles a temperatura ambiente, a diferencia de otros agentes antimicrobianos; esto los hace atractivos para su estudio y aplicación como una alternativa adecuada y natural como aditivos alimentarios.

Se ha determinado que las especies del género *Fusarium* conforman el grupo más importante de los hongos patógenos facultativos. Entre años anteriores hasta la actualidad la frecuencia de deterioro de alimentos por *Fusarium* se ha incrementado a un ritmo constante a nivel mundial (Murray y col., 2009).

Fusarium semitectum, es agente causal del deterioro de una amplia variedad de alimentos como hortalizas, frutos, semillas, granos entre otros. Teniendo en cuenta la incidencia de hongos que atacan a los alimentos en almacén en nuestra región, por ello se realizó la presente investigación con el propósito de determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*); de tal manera que se pueda ofrecer como una alternativa para combatir la contaminación de alimentos en almacén causado por la cepa de *Fusarium semitectum* 12pfs.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*) frente al hongo *Fusarium semitectum*.

Objetivos específicos

- Extraer el aceite esencial de cáscara de naranja mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor, así como determinar sus características fisicoquímicas y organolépticas.
- Conocer la actividad antifúngica a diferentes concentraciones y la concentración óptima antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*), frente al crecimiento de *Fusarium semitectum*.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*), frente al hongo *Fusarium semitectum*.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTECEDENTES

El uso de las plantas medicinales, aromáticas y productoras de especies se remonta a la antigüedad, donde inicialmente fueron empleadas siguiendo el instinto, y más tarde, gracias a los avances de la química, se fueron racionalizando su uso y determinando sus propiedades terapéuticas, aromáticas, etc.(Cueva,2003).

La naranja se produce de manera abundante en el mundo, como también su consumo dentro del país es elevado. Por otro lado se ha especificado que el aceite esencial que se extrae de la cáscara de la misma posee ciertos niveles de actividad antimicrobiana (Gimferrer ,2008) lo que hace atractiva para la extracción y estudio de dicho aceite, pudiendo incluso dar lugar a un mayor aprovechamiento del abundante desecho que significa la cáscara de naranja.

El paso del tiempo, el avance del saber, la tecnificación de los conocimientos y las industrias, ha llevado al hombre a manipular más y mejor las plantas, detallando sus características y sus virtudes, las formas de uso y su aplicación. La sabiduría de la historia nos llega compendiada en la tradición y en la investigación. Las plantas no han

perdido ni un ápice de su valor; es el hombre el que ha de aprender de nuevo a valorarlas, cuidarlas, usarlas y beneficiarlas (Sagarpa, 2009). Se realizaron estudios de *Citrus aurantium L.*, demostrando que toda la planta contiene aceites esenciales y principios amargos (Cáceres, 1995).

En los estudios realizados por (Gimferrer, 2008, -Velásquez, 2010), mencionan el poder antifúngico de los aceites esenciales de cítricos, que éstos se consideran grasas seguras, por lo que podrían utilizarse como aditivos antifúngicos naturales en los alimentos. Asimismo señala que los aceites esenciales de limón, mandarina, pomelo y de naranja presentan actividad antifúngica contra el crecimiento de algunos mohos de importancia en alimentos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium notatum* y *Penicillium verrucosum*. Asimismo referente a la actividad antifúngica, realizaron pruebas antifúngicas trabajando en las concentraciones de 1%, 2%, 4%, 8% y 16%, posteriormente determinaron mediante la técnica de dilución en agar concentraciones inhibitorias entre 8% y 16%, utilizando el aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) contra la cepa *Aspergillus flavus*.

2.2 ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA PLANTA

2.2.1 Descripción taxonómica de la naranja (*Citrus aurantium L.*)

DIVISIÓN : ANTOPHYTA (ANGIOSPERMAE)

CLASE : DICOTILEDONEA

SUBCLASE : ARCHICLAMIDEAS

ORDEN : GERANIALES

FAMILIA : RUTACEAE

GÉNERO : CITRUS

ESPECIE : *Citrus aurantium L.*

NOMBRE : "NARANJO"

Fuente: Acharte (2010)

2.2.2 Descripción botánica de la naranja (*Citrus aurantium* L.)

Árbol leñoso de 3-10m de altura, tronco rollizo, derecho, corteza suave, color café, ramas verdes, espinas no muy puntiagudas. Hojas simples siempre verdes y aromáticas alternas, peciolo alado, ancho 6-13cm de largo, finamente dentadas, con pequeñas glándulas de aceite. Flores muy olorosas de 3-4cm de ancho. Frutos en baya, redondos u oblongo-ovalados de 7-8cm de ancho, a menudo más ancho que largo de color anaranjado o casi rojizo, más o menos áspero, con cáscara gruesa, pulposo, azucarado y ácido. Pericarpio rugoso grueso, amargo con glándulas de aceite; 10-12 segmentos con paredes amargas y pulpa ácida, de varias semillas (Cáceres, 1995).



Figura 1. Planta de la naranja (*Citrus aurantium* L.)

2.2.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE (*Citrus aurantium* L.)

Se encuentra en los valles y zonas tropicales del Perú. Los cítricos se pueden cultivar hasta los 2200 m.s.n.m., así podemos encontrar en la región de Ayacucho.

Estas plantas son originarias del sur de Asia, India e Irán (Schavenberg y Paris, 1980). Su floración y recolección se da en los meses de primavera (Font Quer, 1998).

2.3 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Son sustancias usadas para conservar los alimentos, previniendo el crecimiento de microorganismos y el subsecuente deterioro. Su función tradicional es prolongar la vida de anaquel y preservar la calidad a través de la inhibición de microorganismos deteriorativos. Sin embargo, los antimicrobianos se han utilizado de manera creciente, como intervención primaria para la inhibición o inactivación de microorganismos patógenos en alimentos (Davidson y col., 2005).

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

2.3.1 Modo general de acción de los agentes antimicrobianos

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

Aunque los mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos son distintos y no todos son conocidos, se sabe que la muerte de los microorganismos se basa en una serie de acontecimientos altamente selectivos. Junto a mecanismos físicos y fisicoquímicos, interfieren reacciones puramente bioquímicas. La actividad se debe principalmente a que atacan la pared celular, membrana celular, enzimas metabólicas, la síntesis de proteínas y el sistema genético. Siendo que cada uno de estos puntos es esencial para el desarrollo celular, si uno es atacado o inactivado, la velocidad de crecimiento del microorganismo se ve minimizada (Davidson y col., 2005).

2.3.2 Antimicrobianos naturales

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

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

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

2.4 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son productos generalmente olorosos, obtenidos bien por arrastre de vapor de agua de vegetales o de partes de vegetales, bien por expresión del pericarpio fresco de ciertos citrus. Los aceites esenciales son únicos, volátiles, insolubles en agua y poseen muchas propiedades terapéuticas; tienen gran aplicación en aromaterapia, en el área alimentaria, farmacéutica y en la industria cosmética, entre otras (Olaya y Méndez, 2003).

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

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se debe a la presencia de sustancias bioactivos como flavonoides, terpenos, cumarinas y carotenos (Gimferrer, 2008).

De los millones de plantas existentes en nuestro planeta, se conocen alrededor de 4000 aceites esenciales distintos. Las plantas aromáticas son las que concentran una mayor cantidad de esencias y por tanto, constituyen la materia prima para su obtención, bien sea empleando toda la planta, sólo sus hojas, flores, frutos o raíces, dependiendo de la planta concreta de que se trate (Saavedra, 2002).

La principal ventaja de los aceites esenciales es que pueden utilizarse en cualquier alimento y la FDA las ha considerado como sustancias

GRAS (Generally Regarded as Safe), siempre y cuando su efecto se logre con el mínimo cambio en las propiedades organolépticas del alimento (Gimferrer, 2008; Burt, 2004).

2.4.1 Propiedades físicas y organolépticas de los aceites esenciales

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

Son fácilmente alterables o sensibles a la oxidación, aunque no se enrancian como los lípidos. Poseen tendencia a polimerizarse, dando lugar a la formación de productos resinosos, especialmente aquellos que contienen alcoholes terpénicos insaturados, variando su olor, color y viscosidad. Son aceites grasos, fácilmente solubles en solventes orgánicos, como éter de petróleo, cloroformo, bencol o alcohol absoluto; y casi insolubles en agua; a la que comunican su olor (Velásquez, 2010).

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

2.4.2 Composición de los aceites esenciales

Los componentes de los aceites esenciales son importantes, ya que la composición, tanto cualitativa como cuantitativa, determina las

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

Los aceites esenciales provenientes de frutos cítricos, contienen de 85 a 99% de componentes volátiles y de 1 a 15% de componentes no volátiles. Los primeros son una mezcla de monoterpenos como el limoneno, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados, incluyendo aldehídos como el citral, cetonas, ácidos, alcoholes como el linalol, y ésteres (Costa-Batllo, D.2003).

Entre los componentes de los aceites esenciales, una familia de hidrocarburos, los terpenos son a menudo mayoritarios llegando a alcanzar elevadas concentraciones del 75% al 90% del peso total en aceites esenciales como de los cítricos naranja, limón, mandarina y lima (Ortuño, 2006).

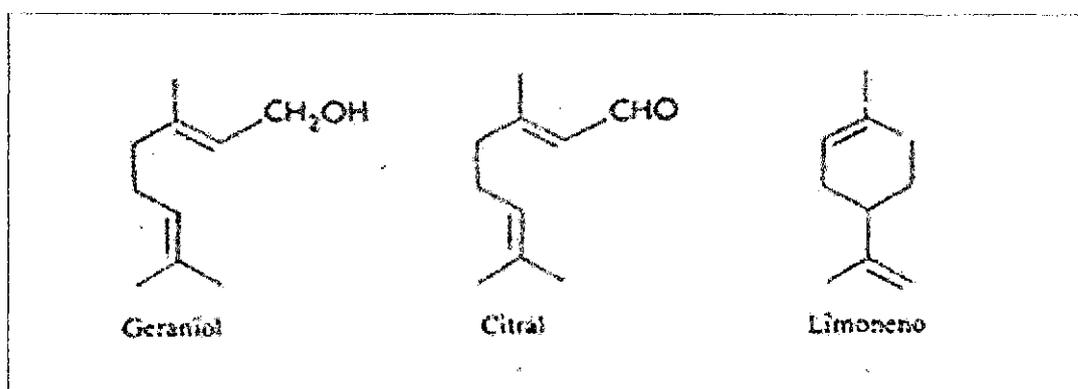
La planta de *Citrus aurantium L.* contiene aceites esenciales y principios amargos (flavonoides). La cáscara del fruto maduro contiene neohesperidina (hasta 14% del fruto verde), nobiletina 5-O-desmetilnobiletina. El aceite esencial de hojas y cáscara contiene d-limoneno, l-linalol, geraniol, metilantranilato y citral (Cáceres, 1995). Constituyendo así el d-limoneno en cantidades de por lo menos el 90% (Remington, 2003). Densidad 0,8451g/mL, índice de refracción 1,4725 y rotación óptica específica +88 a +98 (Cáceres, 1995).

Tabla 1. Composición química del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*)

Compuesto	Composición %	Clasificación
Limoneno	96,62	Monoterpeno
β -myrceno	1,72	Monoterpeno
β -pineno	0,53	Monoterpeno
α -pineno	0,47	Monoterpeno
Alcohol isopropílico	0,32	Alcohol
Citral-Z	0,15	Aldehído
Citral-E	0,18	Aldehído

Fuente: Stashenko et al. (1996).

Figura 2. Estructura química de los componentes del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*)



Fuente: Primo (1995).

2.4.3 Usos medicinales

La corteza del fruto de *Citrus aurantium L.*, contiene gran cantidad de aceite esencial, muy aromático. Se usan extensamente como carminativo y antiespasmódico, en caso de malestares gastrointestinales (Núñez, 1982).

También tienen propiedades medicinales como: antiséptico, antitusígeno, sedante, etc. Los aceites esenciales del género citrus presentan actividad antibacteriana e insecticida de amplio espectro (Cáceres, 1995).

Además tiene la actividad antimicrobiana-insecticida. Por su parte, el aceite esencial representa actividad antifúngica (Laboratorio Biokosma, 2008).

2.4.4 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

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

French (1985) señala que es extremadamente difícil correlacionar la actividad antimicrobiana a un único compuesto o clase de compuestos, ya que los diversos componentes de cualquier aceite pueden actuar sinérgicamente. Por ello, es necesario un enfoque integral para explicar las capacidades antimicrobianas de un aceite esencial, cuyo desempeño podría ser el resultado de cierto balance cuantitativo de varios componentes, donde los efectos sinérgicos prevalecen (Cacciony col., 1998).

Daferera y col., (2000) reportaron que la actividad antifúngica de los aceites esenciales podría deberse a la formación de puentes de

hidrógeno entre el grupo hidroxilo de los compuestos fenólicos del aceite y los sitios activos de ciertas enzimas; mientras que Lucini y col., (2006) indicaron que la inhibición del crecimiento micelar es causada por los monoterpenos presentes en los aceites esenciales. Estos componentes podrían incrementar la concentración de peróxidos lipídicos como radicales hidroxilo, alcoxico y alkoperoxilo y dar como resultado la muerte de la célula (Zecaria, 2008).

Se piensa que la absorción del aceite esencial en el microorganismo es fundamental para la expresión de su actividad y que la absorción depende de la lipofilidad del aceite y del sitio del moho donde está actuando.

Las técnicas comúnmente utilizadas para estudiar las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se centran en la dilución del aceite en agar, reduciendo a la obtención de valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) (Jansen y col., 1986).

Por otro lado, (Gimferrer, 2008.-Velásquez, 2010) estudiaron, mediante dilución en agar, la acción antifúngica de los aceites esenciales de limón, mandarina, toronja y naranja en mohos comúnmente asociados con el deterioro de alimentos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium verrucosum*; llegando a la conclusión de que los cuatro aceites esenciales estudiados muestran capacidad de reducir o inhibir el crecimiento de los mohos mencionados.

2.4.5 Extracción de aceites esenciales

Los aceites esenciales generalmente se aíslan de plantas que no poseen celulosa y lignina, a través de métodos como prensado, extracción, fermentación o destilación. En general los rendimientos de

extracción varían desde 0.1 a 2%, existiendo algunas excepciones, como por ejemplo la badiana china con un rendimiento del 5% o el clavo de olor, con más de 15% aceite esencial (Luck de Ugaz, 1994).

2.4.5.1 Extracción por destilación con arrastre de vapor

La destilación por arrastre con vapor es una técnica utilizada para separar sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles de otros productos no volátiles mezclados con ellas. Es la más comúnmente utilizada, tanto a nivel industrial como de laboratorio, para la producción de aceites esenciales, ya que estos poseen compuestos volátiles y arrastrables por el vapor de agua; además de que es una técnica sencilla y económica, que posee una gran versatilidad a la hora de aplicarlo a materiales vegetales diferentes (Luck de Ugaz, 1994).

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

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

En esta técnica, la muestra se sitúa en un recipiente a través del cual se hace pasar vapor de agua generado en otro recipiente. Se hace pasar una corriente de vapor de agua por la muestra que contiene el compuesto a extraer, lo que ocasiona que se caliente la muestra y el vapor arrastre los componentes volátiles hacia un sistema de

enfriamiento típico de una destilación simple. El destilado se recoge, separa y purifica (Pérez, 2006).

2.5 UBICACIÓN TAXONÓMICA DE *Fusarium semitectum*.

REINO	: FUNGI
DIVISIÓN	: ASCOMYCOTA
SUB DIVISIÓN	: DEUTEROMYCOTINA
CLASE	: SORDARIOMYCETES
ORDEN	: HYPOCREALES
FAMILIA	: NECTRIACEAE
GÉNERO	: FUSARIUM
ESPECIE	: <i>Fusarium semitectum</i>

Fuente: Mural (1995).

Fusarium semitectum, es un hongo de importancia en alimentos, agente causal del deterioro de una amplia variedad de productos como vegetales hortalizas, frutas, semillas, granos entre otros. Es una cepa que presenta un micelio denso, algodonoso de color blanco a marrón, cuando llega a la esporulación, las esporas son dispersas y el micelio aéreo, los esporodoquios forman masas limosas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25° a 37°, es capaz de crecer en un rango de pH de 3,0 a 6,8, su actividad mínima de agua varía de 0,8 a 0,9.

2.5.1 Morfología

La especie *Fusarium semitectum* se muestra con filamentos densos y cotonosos, de micelio aéreo, blanco inicialmente, formado por hifas ramificadas, tabificadas; con microconidios y macroconidios.

Las macroconídias se forman a partir de fiálides típicos, por lo general se agrupan en forma afinada delgada, cortas y pueden tener una abertura fértil (monofialide) o aberturas más fértiles (polifialide). Las microconideas son producidas por los conidióforos de la célula ramificado o no ramificado con moderación resultante de micelio aéreo, o directamente desde la superficie del agar. Hay resistencia de estructuras asexuales y clamidosporas. (García y Picazo, 1999).

Macroscópicamente los hongos dan lugar a filamentos algodonosos, su crecimiento filamentosos varía desde 1mm a mayor longitud de diámetro, y en general es de crecimiento relativamente rápido a las 72 horas (Prats, 2006).

2.5.2 Cultivo e identificación de los hongos

2.5.2.1 Medio de cultivo

Se utilizan medios específicos como el Papa dextrosa, muy rico en glucosa y cuyo pH bajo (pH=5-5,6) dificulta el crecimiento de las bacterias, facilitando el crecimiento de los hongos. Para el crecimiento de hongos filamentosos suele ser suficiente incubar a 30°C por un período máximo de 7 días (Prats, 2006).

El agar presenta propiedades tales como estabilidad, claridad y alta resistencia al metabolismo durante el desarrollo in vitro de microorganismos que lo convierten en agente gelificante de elección.

A. Agar Papa Dextrosa (APD)

Es un polisacárido natural no ramificado y de alto peso molecular, extraído de algas rojas, principalmente del género *Gelidium*. Es termoreversible, es decir, se puede volver a disolver y a gelificar

repetidas veces mediante variaciones en la temperatura y es autoclavable. Su gelificación depende del pH del medio de cultivo, siendo óptima para pH 5,4-5,7. , el APD cumple un rol importante en el medio de cultivo ya que es útil para valorar el aspecto morfológico y la coloración de la colonia. Su alto contenido en carbohidratos condiciona un mayor crecimiento (García y Picazo, 1999).

2.5.2.2 Identificación de *Fusarium semitectum*

Las características morfológicas principales de *Fusarium semitectum* son: colonias densas algodonosas que tienden del color blanco a marrón cuando llega a la fase de la esporulación (Camazo y col., 2005).

2.5.3 Patología y patogenicidad

Se ha determinado que las especies del género *Fusarium* conforman el grupo más importante de los hongos patógenos facultativos. Entre años anteriores hasta la actualidad, la frecuencia de deterioro de alimentos por *Fusarium* se ha incrementado a un ritmo constante a nivel mundial. (Murray y col., 2009).

La fusariosis es el deterioro de alimentos causados por hongos del género *Fusarium*, esta enfermedad es causada por aquellos hongos descomponedores, son comúnmente encontrados en la tierra y que tienen un desarrollo parásito. Se desarrolla en los cultivos o lugares de almacenamiento de alimentos. Su desarrollo varía ampliamente según las plantas y variedades consideradas y en función de las condiciones meteorológicas, favorables de temperatura y humedad en el momento de la infección y de principios de la floración.

En los cultivos se manifiesta como un marchitamiento, empardecimiento y muerte de hojas y partes tiernas pudiendo llegar incluso a causar la muerte de toda la planta, pérdida de color verde en las hojas, seguido de una necrosis que conduce al abatimiento de la planta.

En los alimentos en almacenamiento, los vegetales atacados empiezan a ser descompuestos y adquieren un aspecto rugoso, se tornan de los colores marrón claro a rosados o blanco grisáceos.

El *Fusarium semitectum*, es el principal causante del deterioro de los alimentos, tales como productos de panificación, frutas, hortalizas, semillas, granos entre otros alimentos (Pumarola, 1995).

Respecto a la salud, las dos vías de adquisición de la infección más probables son la respiratoria y la cutánea. Las conidias se inhalan y en el paciente predispuesto causa una infección pulmonar. Por vía cutánea, el paciente puede estar colonizado y posteriormente tener onicomiosis. Desde estas localizaciones el hongo se puede diseminar por vía hematológica a otros órganos. (Brooks y col., 2002)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Procesos Agroindustriales, Transferencia de masa de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia y el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de Enero-Junio del 2014.

3.2 MATERIA PRIMA

Se recolectó 330 frutos de naranja (*Citrus aurantium*) fresca de la variedad Sevilla, las cuales fueron adquiridas de un puesto de frutas del mercado "Nery García Zárate" de la provincia de Huamanga, lugar donde son expendidas. Los frutos presentaban un estado de madurez uniforme, ligeramente limpias y en buenas condiciones fisiológicas (ver Anexo 2).

3.3 MICROORGANISMO DE ENSAYO

Fusarium semitectum 12pfs, contenido en una placa congelada, sellada, pura, adquirido al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (ver Anexo 1).

3.4 MATERIALES, INSUMOS, REACTIVOS Y EQUIPOS

Para el presente trabajo en estudio se utilizó lo siguiente:

3.4.1 Materiales

- Agua destilada
- Tubos de ensayo 1 mL y 5 mL
- Placas petri de 6 x1,5 cm
- Sacabocado de 5mm de diámetro
- Embudo de vidrio 5 y 12cm de diámetro
- Pera de decantación de 25 y 50 mL
- Probetas graduadas de 50, 100 y 1000mL
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 300mL
- Matraz de 100, 250 y 300 mL
- Pipetas de 5, 10, 30 mL
- Asa de kolle
- Varilla de vidrio
- Papel filtro watman
- Papel periódico
- Gradillas
- Soporte universal
- Cocina eléctrica
- Mechero
- Algodón industrial
- Frascos de vidrio
- Frascos ámbar
- Guantes estéril

- Protector nasobucal
- Gorro desechable
- Gasa
- Ligas
- Recipientes plásticos
- Cuchillo
- Olla
- Colador
- Espátula
- Balón de gas

Y diversos materiales de vidrio para los diferentes ensayos.

3.4.2 Insumos

- Almidón de papa
- Agar agar
- Dextrosa

3.4.3 Reactivos

- Alcohol comercial de 80°
- Fenolftaleína alcohólica al 1%
- Ácido sulfúrico P.A. 98% en pureza. MERCK.
- Cloruro de Bario P.A.MERCK.
- Hidróxido de sodio P.A.RIEDEL DEHAEN.

Diversos reactivos de grado analítico y químico, según anexos que describen las técnicas utilizadas en el presente estudio.

3.4.4 Equipos

- Autoclave EVAR .Modelo EV-24, Serie ELV-D.
- Destilador

- Cámara de incubación BINDER. Modelo GMBH, Serie BD 53
- Balanza digital LIDONING TTD. Modelo ESJ200-4 Serie N°05-045363. 230 voltios.
- pH-metro JENWAY. Modelo 3510, Serie 02934.230 VAC.
- Refrigeradora BOSCH. Modelo ECO-TTA56, serie KGN57PL30P.
- Refractómetro tipo ABBE.

Diversos equipos necesarios para el presente estudio, las que se encuentran en el laboratorio de la FIQM y FCB de la UNSCH.

3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.5.1 Procedimiento para la recolección de la muestra

Se colectó naranja fresca madura de tipo comercial, con un estado de madurez intermedio y uniforme, en condiciones aptas; el lugar de colección fue el mercado "Nery García Zárate" de la provincia de Huamanga, del puesto de venta de frutas.

Las muestras fueron transportadas en bolsa plástica al laboratorio de Tránsito de Masa de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia, luego fueron limpiadas, lavadas, peladas, cortadas y ventiladas, para poder facilitar la extracción del aceite esencial. Este proceso se realizó en el mes de Enero del 2014.

3.5.2 Extracción del aceite esencial mediante el flujo de procedimiento para la obtención de aceite esencial.

Se utilizó la cáscara troceada del fruto (ver Anexo 2) y la extracción del aceite se realizó mediante la destilación por arrastre de vapor, utilizando un equipo especialmente diseñado y adaptado (ver Anexo 3), según lo recomendado por (Lock de Ugaz, O.1994).

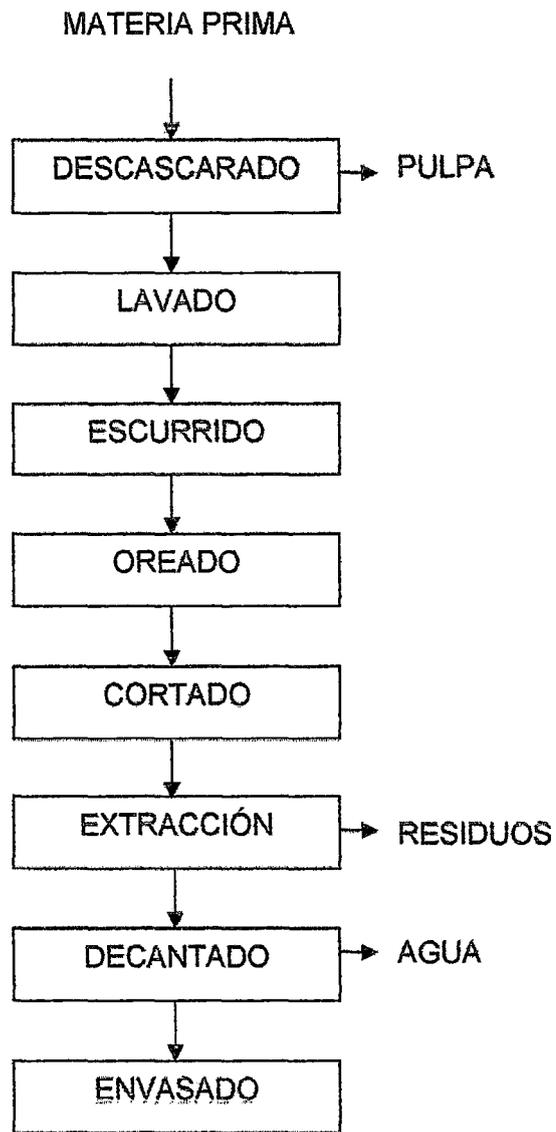


Figura 3. Diagrama de flujo para la obtención de aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*)

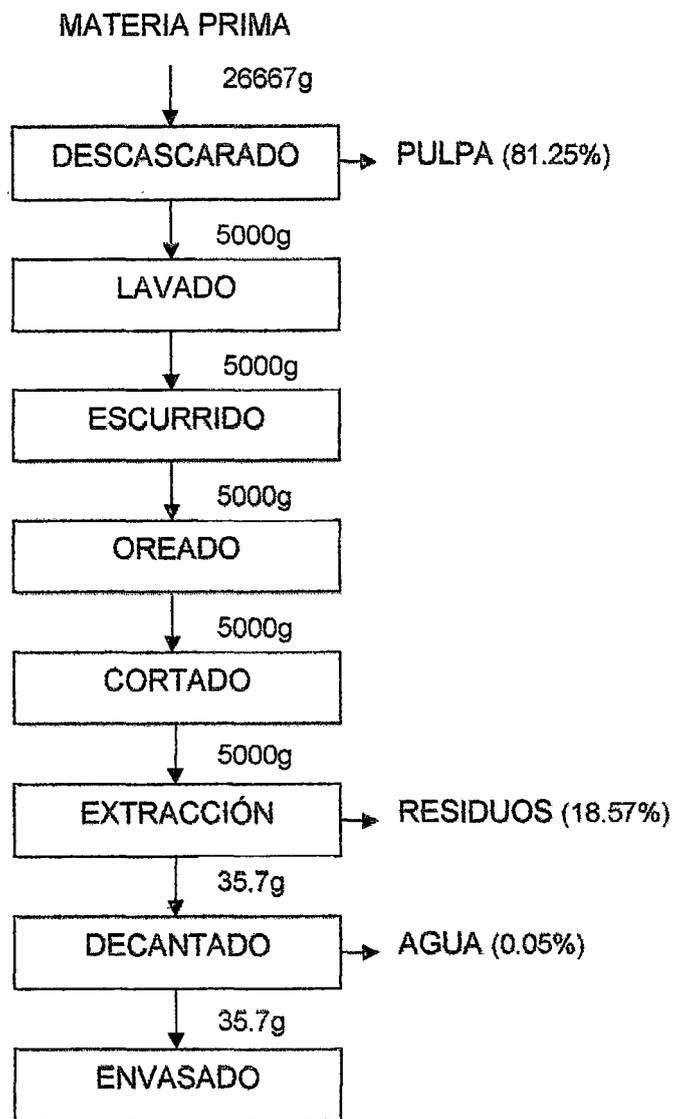


Figura 4. Balance de materia para la obtención de aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*)

A. Materia prima

Se trabajó con la naranja fresca madura de tipo comercial, la cual fue colectada del mercado Nery García, lugar donde son expandidas, con un estado de madurez uniforme.

B. Descascarado

En este proceso, se separó la cáscara de la pulpa de naranja, mediante el pelado mecánico con un cuchillo de mesa, para posteriormente lavar la cáscara y realizar la extracción de su aceite esencial.

C. Lavado

Se realizó el lavado de la cáscara de naranja, liberándolas de impurezas, residuos de tierra y microorganismos, este proceso se realizó mediante un flujo continuo de agua potable y a temperatura ambiente.

D. Escurrido

En esta etapa las cáscaras lavadas con exceso de agua fueron sometidas a una eliminación de la mayor parte del agua, colocándolas encima de recipientes coladores, terminado este proceso se pasó seguidamente al oreado.

E. Oreado

Se procedió a tender la cáscara encima de cartones, con una ventilación a temperatura de ambiente, para eliminar parte de la humedad presente después del escurrido

F. Cortado

Para facilitar la operación de extracción del aceite esencial, se comenzó a trocear y cortar toda la cáscara de naranja, este proceso se realizó en forma manual.

G. Extracción

Se generó vapor en el tanque del equipo para realizar la extracción del aceite, el equipo fue calentado con gas propano, se obtuvo una mezcla de aceite esencial más agua como producto de la condensación, esta mezcla fue colectada en el vaso florentino. Una vez concluida la etapa de extracción, la mezcla de aceite esencial más agua se sometió a un proceso de decantación para ser purificada de impurezas.

H. Decantado

Se eliminó el agua presente con el aceite esencial, se colocó la mezcla obtenida en la pera de decantación, donde debido a la diferencia de densidades se empezó a separar la mayor parte de agua, dejándolo reposar por 24 horas.

I. Envasado

El aceite esencial libre de agua, se envasó en frascos de color ámbar para ser protegidos contra la luz y se conserven sus componentes.

3.5.3 Determinación de las variables de extracción, características organolépticas, fisicoquímicas y el rendimiento del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*).

Las variables que se han considerado en la extracción del aceite esencial fueron la fracción de destilado, rendimiento, temperatura y tiempo.

a) Propiedades organolépticas

Las propiedades organolépticas son las cualidades de las sustancias grasas perceptibles directamente por los sentidos. Por lo tanto su determinación es fundamentalmente subjetiva; en general, no establece métodos concretos y definidos.

Para las determinaciones de estas características, la muestra debe ser agitada en forma adecuada por espacio de unos minutos, las propiedades a evaluar fueron las siguientes:

Aspecto. Se determinó mediante la consistencia, transparencia, claridad o turbiedad, brillosidad, fluorescencia, turbidez, pesadez, etc.

Color. La determinación del color se realizó por observación visual, mediante comparaciones con otros aceites naturales.

Olor. Se hizo por comparaciones con los olores de los aceites naturales utilizando por ejemplo el aceite de palta, soja.

Sabor. Dado los antecedentes con que se cuenta respecto al aceite en estudio, se pudo determinar su sabor sin riesgo alguno de intoxicación con el sentido de gusto, de una manera natural.

Las características organolépticas se detallan en el (ver Anexo 4).

b) Propiedades fisicoquímicas

El aceite extraído de la cáscara de naranja mediante decantación, se separa el aceite de los sedimentos y de otras impurezas que pudieran existir en el fondo de la muestra. Esta separación es importante, debido a que las impurezas sólidas pueden influir en la determinación de sus características fisicoquímicas del aceite.

Las siguientes propiedades fisicoquímicas a determinarse fueron:

- Densidad

La densidad del aceite esencial se determinó mediante la medición de la masa en gramos y del volumen en mililitros, en una probeta. La densidad está expresada en g/mL.

$$p = \frac{m}{v}$$

- Índice de refracción

La medición del índice de refracción del aceite se realizó recurriendo a un refractómetro a 25°C.

El equipo se calibró a cero con agua destilada, para después secar con papel y colocar una gota de muestra sobre el cristal. Para la lectura, se giró la perilla hasta que la zona oscura quede en el centro de las líneas de la pantalla.

- Índice de acidez

En un matraz se procedió a disolver 5g de aceite esencial en 50 mL de alcohol, previamente incorporado con gotas de fenolftaleína, esta solución se tituló con una solución de hidróxido de sodio, el procedimiento se realizó por duplicado, el índice de acidez se calculó con la ecuación:

$$Ia = \frac{(V_{NaOH\ muestra} - V_{NaOH\ blanco}) \times N_{NaOH} \times 56.1}{W_{muestra}}$$

Los valores de las características fisicoquímicas se detallan (Anexo 5).

c) Rendimiento

El rendimiento se determinó luego de haberse extraído la cantidad total de aceite esencial en masa a partir de la cáscara de naranja, una vez habiendo finalizado este proceso, se calculó en base a la siguiente fórmula.

$$\%Rendimiento = \frac{W_2}{W_1} \times 100$$

El proceso de cálculo para determinar el rendimiento obtenido de aceite esencial se muestra en el Anexo 6.

3.5.4 Preparación del medio de cultivo

Se preparó el medio de cultivo adecuado para el crecimiento de hongos del género *Fusarium*, siendo éste el Agar Papa Dextrosa (APD), los ingredientes para su preparación fueron:

Papa	: 200,0g
Dextrosa	: 20,0g
Agar	: 15,0g
Agua destilada	: 1000mL
pH	: 5,6

La forma de preparación fue la siguiente: se pelaron las papas, previamente troceadas, luego éstas se pasaron a hervir por un espacio de 30 a 40 minutos, para extraer gran parte del almidón, una vez que se obtuvo esta concentración, se procedió a colarlo y desechar toda la parte sólida, el líquido colado el cual contiene al almidón se diluyó en un litro de agua destilada, luego se le adicionó la dextrosa y posteriormente el agar, se continuó agitando y diluyendo hasta la obtención de una solución homogénea, luego se procedió a esterilizar el preparado del APD en un autoclave a 15PSI (121°C)/15min, para obtener un medio de cultivo estéril.

Para la preparación del Caldo Papa Dextrosa el procedimiento es el mismo, con la diferencia de que ya no se agrega el agar. (Ver Anexo 8)

3.5.5 Preparación Escala Mc Farland

Se realizó la preparación del estándar de turbidez Mc Farland, para usarlo como referencia en suspensiones microbiológicas y hacer el

conteo visualmente del número de microorganismos por mililitro presente, según la escala que va desde 0,5 a 10.

Para la preparación de la escala 0,5 Mc Farland se utilizó Cloruro de Bario (BaCl_2) al 1% mezclada con una solución de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) al 1%, con esta preparación se buscó obtener una concentración mínima de $1,5 \cdot 10^8 \text{ UFC/mL}$ para el presente trabajo en estudio.

3.5.6 Preparación de las diluciones de la muestra

Para la determinación de la actividad antifúngica se prepararon concentraciones de 1%, 2%, 4% y 8%, siguiendo la metodología de la formulación de agar con diferentes cantidades de aceite.

Para la determinación de la concentración óptima antifúngica, las diluciones hechas para el aceite esencial, se realizó de acuerdo al requerimiento microorganismo en estudio y el comportamiento de crecimiento realizado en la siembra por el método de difusión en pocillo, mediante la formulación de agar con diferentes cantidades de aceite.

3.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Según la metodología de Lozina y col. (2005), para la determinación de los halos de inhibición y la tesis (Palomino y Uribe2007), para determinar la CMI y la concentración óptima antifúngica.

3.6.1 Preparación de *Fusarium semitectum* 12pfs

Para activar la cepa de *Fusarium semitectum*12pfs, se procedió a inocular, en una placa con agar papa dextrosa (APD), utilizando un asa de kolle estéril se realizó una siembra por puntura en los

extremos y centro de la placa para poder facilitar el aislamiento de colonias. Se procedió a incubar a una temperatura de 30°C por 5-7 días.

Para la utilización de la cepa se procedió a resembraren Agar Papa Dextrosa (APD) contenido en dos placas, dejándolas incubar a temperatura de 30°C por 5-7 días.

3.6.2 Preparación del inóculo o suspensión

Se procedió a seleccionar las colonias del agar de cultivo, se tocó la colonia *Fusarium semitectum* por arriba con un asa de kolle y el crecimiento se transfirió a un tubo con 4 a 5 mL de caldo de nutritivo, se incubó a 30°C por 5 días.

La turbidez del inóculo se ajustó con el caldo nutritivo obteniéndose así una turbidez ópticamente similar al estándar de 0.5 de la escala de Mc Farland. Se realizó este paso visualmente, teniendo en cuenta la luz adecuada, comparando así el inóculo con el estándar de 0.5 de la escala de Mc Farland contra un fondo blanco.

3.6.3 Determinación del halo de inhibición

En 12 frascos tapa roscas de dilución previamente esterilizados, se agregaron 40 mL de agar papa dextrosa (APD). A cada frasco se adicionó el aceite esencial de cáscara de naranja para conseguir las siguientes concentraciones 1%, 2%, 4% y 8%; se agitaron intensamente hasta que quedó bien integrado el aceite con el agar, para luego colocar el agar en placas petri, seguidamente esperar a que se solidifique. Una vez sólido el agar, se realizaron pocillos en la parte central de la placa, con un sacabocado de un diámetro de 5 mm, los cuales fueron llenados con la preparación del inóculo que contiene

a la suspensión de *Fusarium semitectum* 12pfs con una cantidad de 1mL, acompañado del control en otra placa independiente, que no se le incorporó nada de aceite esencial. Se incubaron a 30°C y se observaron los halos de inhibición a los 7 días (Anexos del 9 al 12), luego se realizó la medición del diámetro del halo formado. Aquellos que tuvieron halos de inhibición similar o superior a la placa de control, se utilizó para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

3.6.4 Determinación de la concentración óptima antifúngica

Para determinar la concentración óptima antifúngica se procedió a partir de la determinación del halo de inhibición, realizándose de la siguiente manera:

Una vez realizada la siembra en las placas petri, al término de la incubación de 30°C por 7 días, el cultivo de *Fusarium semitectum* 12pfs, muestra diferentes longitudes de crecimiento, aquella concentración utilizada de aceite esencial en el cultivo, para la cual se observe ausencia y escaso crecimiento de los halos de inhibición de *Fusarium semitectum* 12pfs, corresponderá a la concentración óptima antifúngica (ver Anexo 11).

3.6.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

El cultivo de *Fusarium semitectum* 12pfs fue ajustado al estándar de 0.5 de la escala de Mc Farland. Para hallar la CMI se prepararon 15 tubos previamente esterilizados y rotulados del número 1 al número 15.

A continuación se detalla el procedimiento:

- A partir del tubo N° 1 hasta el tubo N° 15 se agregó 1mL del caldo nutritivo.

- Posteriormente se agregó 1mL de la concentración del aceite esencial al tubo N°1, a partir del cual se traspasó 1mL al tubo N° 2 y así sucesivamente hasta el tubo N° 14, del tubo N° 14 se extrajo 1mL y se descartó. El tubo N° 15 no recibió aceite esencial siendo éste el control.

- Luego se agregó 1mL del inóculo de *Fusarium semitectum* 12pfs a todo los tubos y se llevó a incubación a 30°C por 5días (Palomino y Uribe, 2007) (ver Anexos del 13 al 16).

Tabla 2. Concentraciones decrecientes de las diluciones del aceite esencial.

Tubos	Aceite esencial (mg/ml)		
	1%	2%	4%
1	0,785	0,787	0,886
2	0,778	0,784	0,808
3	0,774	0,781	0,775
4	0,772	0,773	0,766
5	0,769	0,769	0,746
6	0,766	0,768	0,737
7	0,733	0,764	0,729
8	0,719	0,763	0,728
9	0,707	0,745	0,726
10	0,693	0,729	0,724
11	0,674	0,709	0,712
12	0,667	0,698	0,706
13	0,666	0,674	0,702
14	0,632	0,666	0,681

3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el presente trabajo se formó cuatro grupos de diferentes concentraciones y cada grupo de tres repeticiones con *Fusarium semitectum* 12 pfs, distribuido de la siguiente manera:

Grupo I : Administrado con aceite esencial al 1% de concentración

Grupo II : Administrado con aceite esencial al 2% de concentración

Grupo III : Administrado con aceite esencial al 4% de concentración

Grupo IV : Administrado con aceite esencial al 8% de concentración

Control : Administrado sin aceite esencial

Para determinar el efecto antifúngico se procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de la muestra y del control, los que permitieron determinar la concentración ideal que mostró una mayor eficacia antifúngica en relación a la muestra de control elegida como patrón.

Para el cálculo de porcentaje de inhibición se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{diámetro del halo de inhibición de la muestra}}{\text{diámetro del halo de control}} \times 100$$

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se procesaron en cuadros mediante el modelo estadístico Diseño Completo de Bloques al Azar (DCBA), el análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey, con un nivel de significancia de 0,05, para ello se usó el programa SPSS 21.

Modelo estadístico

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ijk} : Observación individual

μ : Media general

τ_i : Concentración de aceite esencial

β_j : Crecimiento de los halos de inhibición

ε_{ij} : Efecto del error experimental

IV.RESULTADOS Y DISCUSIONES

Un estudio realizado sobre el aceite esencial de la naranja recuperado de la piel del fruto, reporta un mayor rendimiento de aceite mediante la extracción con vapor de agua, especialmente a medida que aumenta el flujo y la presión. El aceite de limón y naranja contiene más del 90% de limoneno, componente mayoritario en su composición normal y además, en menor proporción, contiene una gran cantidad de terpenos. La cáscara de naranja que es considerado un residuo, se amonta al aire libre, con este estudio se pretende añadir un valor agregado al fruto, por la aplicación potencial que se puede dar a la cáscara, a partir de la extracción y comercialización de su aceite esencial (Yañez y col., 2007).

4.1 EXTRACCIÓN DEL ACEITE

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

4.2 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS, FISICOQUÍMICAS Y EL RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE NARANJA (*Citrus aurantium L.*)

Las variables de extracción del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*) presentaron los siguientes resultados:

Tabla 3: Variables de extracción del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*)

Fracción	Volumen (mL)	Rendimiento (%)	Temperatura °C	Tiempo(h)
F1	42mL	0.71%	22	1
Residuos	5826 mL	98.49%	28	1.5
Pérdidas	14.4 mL	0.24%		

Fuente: Elaboración propia

El aceite esencial de *Citrus aurantium L.* se presentó transparente, de color, sabor y aspecto característico, con una densidad de 0,850 g/ml, índice de refracción de 1,472 valores que se aproximan bastante con el rango reportado por (Cáceres, 1995) en el cual la densidad y el índice de refracción son de 0,8451g/ml y 1,4725 respectivamente, en cuanto al color varía del amarillo claro al anaranjado oscuro. (Velásquez, 2010). Mencionó una densidad de 0,860g/ml y el índice de refracción de 1,470 para el aceite esencial de cáscara de naranja, por lo tanto los resultados tanto para la densidad y el índice de refracción de este trabajo se encuentran dentro de estos parámetros estudiados.

Como se puede observar, la densidad del aceite es menor a la del agua, característica que era de esperarse. Esta característica es la responsable de hacer posible la separación del aceite del agua al final del proceso de destilación, también el índice de refracción, se encuentra dentro de los parámetros de referencia bibliográfica, este valor nos permite realizar la prueba fisicoquímica en el control de pureza y calidad de aceites puros.

El compuesto predominante en el aceite esencial de la naranja (*Citrus aurantium L.*) es el limoneno, presente en un 96,62%, citral 0,18% de acuerdo con el análisis estudiado por espectrometría de masas (Stashenko, 1996). La eficacia antifúngica de algunos aceites esenciales se ha relacionado con el contenido de monoterpenos. Entre ellos el limoneno; así como la presencia de citral (Gimferrer N., 2008). Sin embargo, es sumamente difícil correlacionar la actividad antimicrobiana con los componentes de manera individual. French (1985) señala que los diversos componentes que conforman el aceite deben actuar de manera sinérgica para inhibir el crecimiento de los microorganismos.

La extracción del aceite se llevó a cabo con un rendimiento aproximado del 0,71% (p/p), ya que para 5000g de cáscara de naranja fresca, se obtuvieron alrededor de 42mL (35,7g) de aceite, tras un proceso de destilación de alrededor de tres horas, partiendo desde la carga de cáscara al sistema y calentamiento del agua.

El rendimiento de extracción obtenido es aceptable, ya que se ha reportado que la mayoría de los aceites cuentan con un rendimiento de extracción de 0,5 a 2% y, particularmente para naranja oscilan entre 0,5 y 0,8%, el cual depende de la variedad y madurez de la fruta, equipo y método de extracción, preparación de la muestra y solventes utilizados (Lock de Ugaz, 1994).

4.3 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

4.3.1 Efectos de la concentración por el método de siembra difusión en pocillo y determinación de la concentración óptima

Se ha determinado que las especies del género *Fusarium* conforman el grupo más importante de los hongos patógenos facultativos. Entre años anteriores hasta la actualidad la frecuencia de infección de alimentos por *Fusarium* se ha incrementado a un ritmo constante a nivel mundial. (Murray y col., 2009).

La presencia de *Fusarium semitectum* está vinculado en gran parte con los alimentos, siendo un agente causal del deterioro de una amplia variedad de productos como, panificación, vegetales, semillas entre otros. En los alimentos en almacenamiento, los vegetales atacados adquieren un aspecto rugoso, se vuelven marrón claro, rosados o blanco grisáceos (Pumarola, 1995).

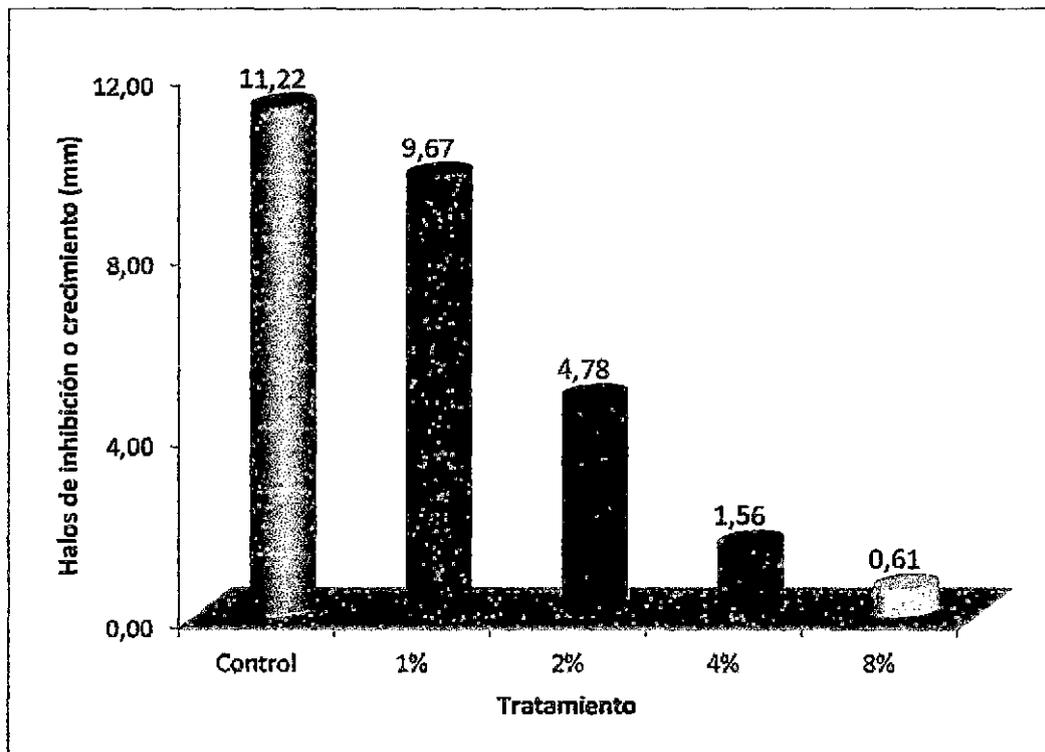


Figura 5. Promedio de los halos de inhibición por efecto del aceite esencial de naranja *Citrus aurantium* L. frente al hongo *Fusarium semitectum* 12pfs. Ayacucho, 2014.

Tabla 4. Análisis de varianza para los halos de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. y del control frente a *Fusarium semitectum* 12pfs.

ANOVA

FUENTE DE VARIACIÓN	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
CONCENTRACION (C)	586,578	4	146,644	83,643	0,000
PLACAS (P)	1,600	2	0,800	0,456	0,637
Error	66,622	38	1,753		
Total	2422,000	45			
Total corregida	654,800	44			

$R^2=0,955$

CV=0,29

En el cuadro de análisis de varianza se observa que existe una diferencia significativa en las distintas concentraciones practicadas, a un nivel de significancia del 5%, de ello se deduce que las concentraciones tienen efecto inhibitorio frente a los halos de crecimiento.

Tabla 5. Prueba de Tukey para halos de inhibición

CONCENTRACION	Subconjunto		
	1	2	3
3%	0,61		
4%	1,56		
2%		4,78	
1%			9,67
CONTROL			11,22

En la tabla 4 del Análisis de Varianza, las medidas de los halos de inhibición de las concentraciones de aceite esencial de *Citrus aurantium L.*, del 1%(9,67mm), 2%(4,78mm), 4%(1,56mm) y 8%(0,61mm), son menores al control (11,22mm), siendo los resultados estadísticamente significativo ($p<0,05$).

El aceite esencial de naranja (*Citrus aurantium L.*), a la concentración del 4% presenta una medida del halo de inhibición de $1,56 \pm 0,53$ mm, el cual es estadísticamente significativo($p<0,05$) al halo de inhibición del 8% que tiene un valor de $0,61 \pm 0,22$ mm, como también se aprecia que la concentración del 1% y 2% que tiene una medida del halo de inhibición de $9,67 \pm 1,22$ mm y $4,78 \pm 0,83$ mm respectivamente, el cual es estadísticamente significativo($p<0,05$) al halo de inhibición del control que tiene un valor de $11,22 \pm 1,72$ mm, tal como se muestra en la tabla 4y en el análisis de comparaciones múltiples de Tukey, Tabla 5 y en los datos descriptivos (Anexo 17).

En el coeficiente de variabilidad de las concentraciones de 4% y 8% del aceite esencial, presentaron resultados del 0,28 y 0,05 respectivamente, con significativa variación en las repeticiones (Anexo 17).

Como se ha observado, el aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*), agregado mediante la técnica de difusión en pocillo, es efectivo contra el crecimiento de *Fusarium semitectum 12pfs*, habiéndose inhibido su crecimiento en su mayoría utilizando la concentración de 8%.

En la Figura 5, se puede observar el modo en que disminuyó el crecimiento del microorganismo con el incremento de la concentración de aceite en el agar, esto es una clara señal de que el uso de este método con la incorporación del aceite esencial provoca un retraso en el crecimiento del microorganismo, el crecimiento disminuye conforme se incrementa la concentración, partiendo de 1% hasta llegar a 8%, dando como resultado que a la concentración de 8% el crecimiento del *Fusarium semitectum 12pfs* fue casi nula, es decir se mostró trazas de crecimiento del microorganismo.

De esto se deduce que la concentración óptima antifúngica de aceite esencial de naranja (*Citrus aurantium L.*) aplicando la técnica de difusión en pocillo contra el crecimiento de *Fusarium semitectum* 12pfses del 8%. (Gimferrer, 2008) Reportó una concentración de 9% de aceite esencial de naranja para inhibir completamente el crecimiento de *Aspergillus flavus* durante un periodo de 9 días. Dicho valor no se aleja demasiado del rango obtenido en este estudio, como también es necesario mencionar que la comparación se ha realizado con el hongo del género *Aspergillus* debido a que existen investigaciones hechas para este tipo de cepa, y por tener características similares al hongo estudiado en ese trabajo, como se sabe no existe una investigación específica para esta especie de hongo, pero sí investigaciones hechas con especies muy semejantes a la cepa estudiada, es por ello que el propósito del trabajo fue de realizar el efecto antifúngico del aceite esencial de cáscara de naranja con la cepa *Fusarium semitectum* 12pfs. Se ha reportado que las diferencias en el efecto antimicrobiano en un mismo tipo de aceite esencial pueden atribuirse a factores como la calidad de la fruta, las condiciones ecológicas en que se cultivó, así como su grado de madurez al momento de la extracción.

La alta bioactividad de los aceites esenciales, se ha reportado previamente (French, 1985), indicó que las moléculas lipofílicas en medio acuoso, tienden a asociarse entre ellas formando micelas, lo que reprime el acoplamiento y absorción de los componentes del aceite al organismo objetivo, lo cual es esencial para la expresión de su bioactividad.

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

4.3.2 Porcentajes de inhibición

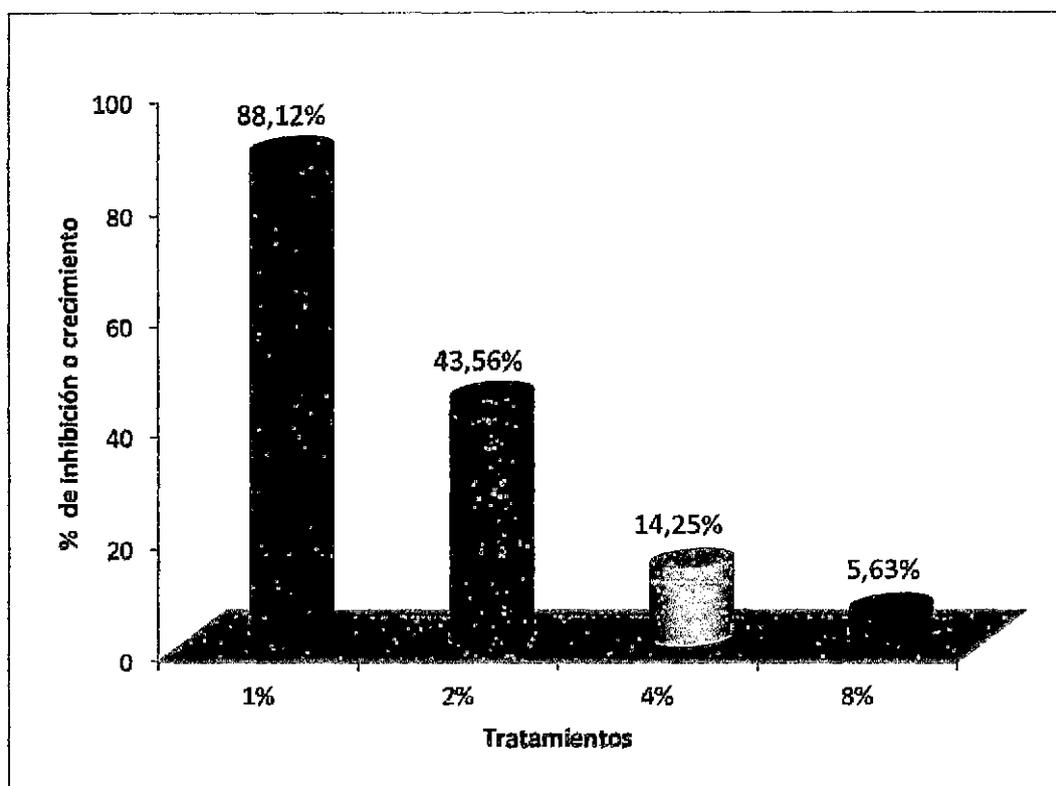


Figura 6. Porcentaje de inhibición del aceite esencial de naranja *Citrus aurantium L.* frente al hongo *Fusarium semitectum 12pfs.* Ayacucho, 2014.

Para una mejor interpretación de resultados se realizó el promedio de porcentajes de inhibición (Figura 5), cuyo resultado se obtuvo después de medir los diámetros de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de la muestra y del control, el cual permitió determinar la concentración ideal que mostró una eficacia antifúngica en relación al control tomado como patrón.

Tabla 6. Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. frente a *Fusarium semitectum* 12pfs.

ANOVA

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
CONCENTRACION	337284,627	3	112428,209	774,860	0,000
Error	46430,346	320	145,095		
Total	847703,000	324			
Total corregida	383714,972	323			

R²=0,914

CV=0,21

En el cuadro de análisis de varianza para porcentajes, se observa que existe diferencia significativa a un nivel de significancia de 5%, de ello se deduce que las concentraciones practicadas tienen efecto inhibitorio en los halos de crecimiento en cuanto a la evaluación en porcentaje.

Tabla 7. Prueba de Tukey para porcentajes (%) de inhibición.

CONCENTRACION (%)	Subconjunto			
	1	2	3	4
8	5,63			
4	14,06			
2	43,56			
1	88,12			

En la tabla 6 del Análisis de Varianza, los porcentajes de inhibición del aceite esencial de *Citrus aurantium* L., correspondientes a las concentraciones 1%,

2%, 4%, 8% respecto al control fueron de 88,12%, 43,56%, 14,25% y 5,63% respectivamente, siendo estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

De acuerdo al análisis de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 7) y en los datos descriptivos del Anexo 18, los porcentajes de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de *Citrus aurantium L.*, del 1%, 2%, 4% y 8%, son estadísticamente significativo ($p < 0,05$), los cuales muestran valores del $88,12 \pm 19,33\%$, $43,56 \pm 10,88\%$, $14,25 \pm 5,31\%$ y $5,89 \pm 2,01\%$, respectivamente, determinando que estas concentraciones tienen efecto antifúngico diferente, siendo estadísticamente significativo a ($p < 0,05$).

4.3.3 Efectos de la Concentración Mínima Inhibitoria

Tabla 8. Resultados de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de naranja *Citrus aurantium L.* a las concentraciones de 1%, 2% y 4%, frente al hongo *Fusarium semitectum* 12pfs. Ayacucho, 2014.

Tubos	Aceite esencial (mg/ml)					
	1%		2%		4%	
1	0,785	S	0,787	S	0,886	S
2	0,778	S	0,784	S	0,808	S
3	0,774	S	0,781	S	0,775	S
4	0,772	S	0,773	S	0,766	S
5	0,769	S	0,769	S	0,746	S
6	0,766	S	0,768	S	0,737	S
7	0,733	S	0,764	S	0,729	S
8	0,719	S	0,763	S	0,728	S
9	0,707	S (CMI)	0,745	S	0,726	S
10	0,693	R	0,729	S	0,724	S
11	0,674	R	0,709	S(CMI)	0,712	S
12	0,667	R	0,698	R	0,706	S
13	0,666	R	0,674	R	0,702	S(CMI)
14	0,632	R	0,666	R	0,681	R

S: SENSIBLE

R: RESISTENTE

(Ingraham, 1998), sostiene que el tubo transparente que contenga la concentración de sustancia más baja (máxima dilución) corresponderá a la CMI de la sustancia. Si los microorganismos no crecen en los tubos de ensayo querrá decir que han muerto.

Los resultados de este procedimiento muestran que en la Tabla 8, la Concentración Mínima Inhibitoria CMI del aceite esencial de naranja (*Citrus aurantium L.*) frente a *Fusarium semitectum 12pfs*, presentó 0,706 g/ml, siendo este valor una dilución promedio de aceite esencial de cáscara de naranja de la Concentración Mínima Inhibitoria entre las diluciones del 1%, 2% y 4%.

V.CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*) al 8%, presentó mayor actividad antifúngica, respecto a las demás concentraciones, con halo de inhibición de 0,61mm; inferior al control que presentó 11,22mm, siendo estadísticamente significativo ($p<0,05$).
2. El aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*) extraído mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor, se presentó de aspecto transparente, líquido y viscoso, olor acentuado y sabor ácido, con una densidad de 0,850 g/ml, índice de refracción de 1,472 y rendimiento de 0,71%.
3. Las concentraciones de aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*) al 1%, 2%, 4% y 8%, presentaron actividad antifúngica con halos de inhibición de 9,67mm, 4,78mm, 1,56mm y 0,61mm respectivamente, siendo estadísticamente significativo ($p<0,05$), reportando la concentración óptima antifúngica a la concentración del 8%.
4. La Concentración Mínima Inhibitoria CMI, frente a *Fusarium semitectum* producido por el aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*), fue de 0,706 g/ml.

VI.RECOMENDACIONES

1. Proseguir con el estudio del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*), con la finalidad de determinar si tiene efecto en otras especies de hongos.
2. Realizar estudios de toxicidad del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*), con el objeto de usarlo como aditivo alimentario.
3. Continuar con el estudio del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*) para su utilización como revestidores naturales en la conservación de alimentos.
4. Incentivar el estudio de las plantas aromáticas utilizadas tradicionalmente, sobre todo en relación a las propiedades antimicrobianas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Acharte, D. (2010)** Actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja aplicado sobre *Candida albicans*. Tesis UNSCH. Ayacucho-Perú.
2. **Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Fang, D.Q. y Kim, J.J. (1995)** Preformed antifungal compounds of citrus fruit: effect postharvest treatment with and growth regulators. *J. Agr. Food. Chem.*43:1062-1066.
3. **Brooks, G., Butel, J. y Morse, S. (2002)** Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17ava Edición. Editorial El Manual Moderno. México.
4. **Caccioni, D., Guizzardi, M., Biondi, D., Renda, A. y Rubertob, G. (1998)** Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International journal of food microbiology*. Pp.43-73.
5. **Cáceres, A. (1995)** Plantas de uso medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Universidad San Carlos. Guatemala.
6. **Camazo, C., López, I. y Díaz, R. (2005)** Manual Práctico de Microbiología 3era Edición. Editorial MASSON S.A. Barcelona – España.
7. **Coronel, C.P. (2004)** Vapores de extractos de especias y condimentos como agentes antimicrobianos. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas, Puebla. México.
8. **Costa-Batlíori, D. (2003)** Antioxidantes naturales en alimentación animal. Conferencia Inaugural del Curso Académico 2003-2004. Real Academia de Ciencias Veterinarias. Citado en Ramírez, M. (2008). Extracción por arrastre de vapor y análisis de propiedades antioxidantes del aceite esencial de romero. Tesis de licenciatura. Universidad de las Américas, Puebla. México.

9. **Cueva, A. (2003)** Enciclopedia Plantas Medicinales. 1era Edición. Editorial A.F.A. Editores Importadores S.A. Lima- Perú.
10. **Daferera, D.J., Ziogas, B.N., y Polissiou, M.G., (2000)** Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungi toxicity on *Penicilium digitatum*. Journal Agricultural and food Chemistry. 48:2576. Citado en Fernández-López, J. y Pérez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. P. 1137. Food control. 19:1130.
11. **Davidson, M., Sofos, J.N. y Branen, A.L. (2005)** Antimicrobials in Food. Tercera edición. CRC Press. Boca Raton, Florida, EE.UU.
12. **Fisher, K. y Phillips, C. (2008)** Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? Trends in food science and technology.19:156.
13. **Font Quer, P. (1998)** Plantas Medicinales. Editorial Labor. S.A. Barcelona-España.
14. **French, R. (1985)** The bio-regulatory action of flavor compounds on fungal spores and other propagules. Ann. Rev. Phytopatol.23:173.
15. **García, J. y Picazo J. (1999)** Compendio de Microbiología Médica. Editorial Ediciones Harcourt. Madrid-España.
16. **Gimferrer N., (2008)** El poder antifúngico de los aceites esenciales de cítricos.www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2008/05/14/176888.php
17. **Guenther, E., Gilbertson, G. y Koenig, R.T. (1973)** Essential oils and related products. Anal. Chem, 45(5): 45-67.
18. **Ingraham, J. e Ingraham, C. (1998)** Introducción a la Microbiología. 1era edición. Editorial Reverté S.A. Barcelona-España.
19. **Inouye, S. (2003)** Laboratory evaluation of gaseous essential oils. Int. J. aromatherapy. 13(21):95.
20. **Jansen, A.M., Scheffer, J.J.C. y Baerheim Svendsen, A. (1986)** Antimicrobial screening of essential oils. Aspects of the agar overlay technique. En "progress in essential oil

- research".Ed.E.J.Brunke.p.429. Walter de Gruyter. Nueva York, EE.UU.
21. **Jay, j. (1996)** Modern Food Microbiology. Van Nostrand Reinhold. Nueva York, EE.UU.
 22. **Jiménez, M.C., Soto, J. y Villaescusa, M.A.(2006)** Química física para ingenieros químicos. Editorial de la UPV. Valencia España.
 23. **Lab. Biokosma. (2008)**Naranja amargo.
www.productosbiokosma.com.ar/monografias/naranjaamargo.doc.
 24. **Lock de Ugaz, O. (1994)**Investigación Fitoquímica: Métodos en el uso de productos naturales. 2da Edición. Fondo Editorial de la PUCP. Lima- Perú.
 25. **Lozina, L., Boehringer, S. y Acosta, O. (2005)** Extrapolación en una Forma Posológica de valores obtenidos *in vitro* sobre actividad antifúngica del propóleo. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas Argentina. Resumen: v-018.
 26. **Lucini, E.I., Zunino, M.P., López, M.L., y Zygodlo, J.A. (2006)**Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum*Berk. Journal of phytopathology. 154:441.
 27. **Luck, E. y Jager, M. (1997)** Antimicrobial Food Additives: Characteristics, Uses, Effects. Segunda Edición. Springer. Berlín. Alemania.
 28. **Matamoros, L.B.A. (1998)** Actividad antimicrobiana de mezclas sorbato de potasio sobre mohos deteriorativos de frutas. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas. Puebla, México.
 29. **Mural, R. (1995)** El Manual de Microbiología Clínica. 6ta edición. Editor Ellen J. La Biblioteca de Congreso. Washington D.C.
 30. **Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller M, y col., (2009)** Microbiología Médica. 6ta edición. Editorial Elsevier. Barcelona-España.
 31. **Núñez, E. (1982)** Plantas Medicinales de Puerto Rico. 1era Edición. Editorial de la universidad de Puerto Rico. San Juan – Puerto Rico.

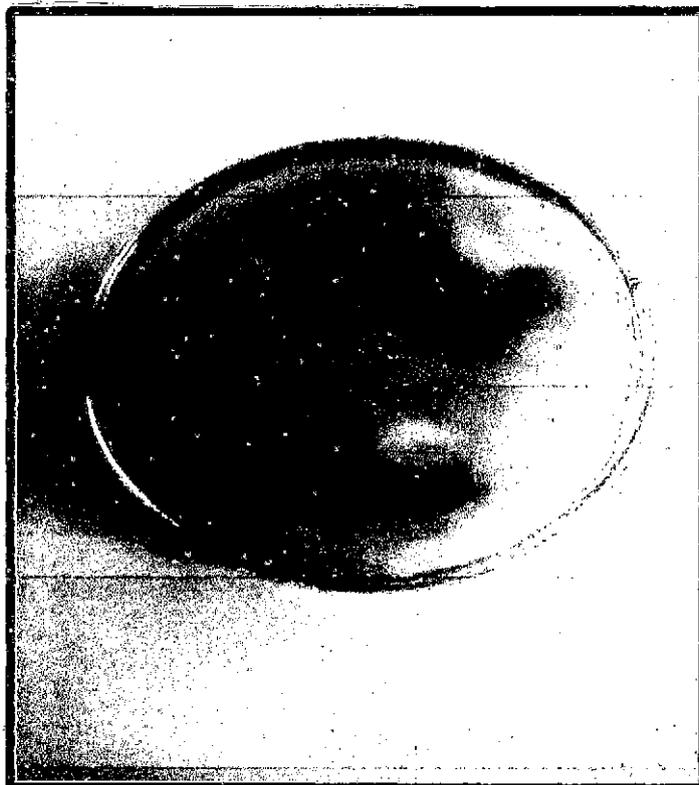
32. **Olaya, J. y Méndez, J. (2003)** Guía de Plantas y Productos Medicinales. 1era Edición. Editorial Convenio Andrés Bello. Bogotá-Colombia.
33. **Ortuño, M. (2006)** Manual Práctico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes. 1era Edición. Editorial AIYANA Ediciones. España.
34. **Palomino, M. y Uribe, C. (2007)** Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos etanólico e hidroalcohólico de las semillas de *Carica papaya L.* "papaya" Tesis Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Ica- Perú.
35. **Pauli, A. (2001)** Antimicrobials properties of essential oils constituents. Int. J. Aromatherapy. 11(3): 126. Citado en Pérez, T.F. (2006). Efectividad de los vapores de aceites de tomillo y orégano como agentes antibacterianos. P. 20. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas, Puebla, México.
36. **Pérez, T.F. (2006)** Efectividad de los vapores de aceites de tomillo y oréganos como agentes antibacterianos. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas, Puebla, México.
37. **Prats, G. (2006)** Microbiología Clínica. 1era Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid-España.
38. **Primo, E. (1995)** Química orgánica básica y aplicada. Tomo II. Editorial Reverté S.A. Barcelona-España.
39. **Pumarola, A., (1995)** Microbiología y Parasitología Médica. 2da Edición. Editorial MASSON, S.A. Barcelona - España.
40. **Rémington, G. (2003)** Farmacia. Tomo I y II. 20ava edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires- Argentina.
41. **Saavedra, R., (2002)** Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* "orégano" Tesis UNSCH. Ayacucho – Perú.
42. **Sagarpa, (2009)** Naranja. disponible:
<http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ventanalM.php?idCat=188&url0w4.siap.gob.mx/AppEstado/Mografias/Monografias2/Naranja.htm> adquirido: 18/enero/2010.

43. **Sánchez, F.J. (2006)** Extracción de Aceites Esenciales: Experiencia colombiana. II Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas: Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira:1-8.
44. **Schavenberg, P. y Paris, F. (1980)** Guía de las Plantas Medicinales. 4ta Edición. Editorial Omega. Barcelona-España.
45. **Stashenko, E.E., Martínez, R., Pinzón, M.E. Y Ramírez, J. (1996)** Changes in chemical composition of catalytically hydrogenate oil (*Citrus aurantium*). Journal of Chromatography A. 752(1-2):217.
46. **Velásquez M., (2010)** Actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja, aplicado por adición directa o generación de vapores. Tesis UDLAP. México.
47. **Yáñez, X., Lugo, L. y Parada, D. (2007)** Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*), variedad valencia cultivada en Labateca-Colombia. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, año/vol. 5, número 001. Universidad de Pamplona Bucaramanga, Colombia. pp: 3-8.
48. **Zecaria, D., (2008)** Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos. Laboratorio Calier. www.calier.es/pdf/microsoft_word_a_ceites_esen_como_promotores.pdf.

ANEXOS

ANEXO 1

Figura 7. Cepa conservada de *Fusarium semitectum* 12pfs, obtenido del Laboratorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH. Ayacucho, 2014.



ANEXO 2

Figura 8. Frutos de *Citrus aurantium* L., recolectados en el mercado Nery García Zárate. Ayacucho, 2014.



Figura 9. Troceado de la cáscara de la cáscara de naranja (*Citrus aurantium* L.). Ayacucho, 2014.



ANEXO 3

Figura 10. Procedimiento de extracción del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*), por arrastre de vapor. Ayacucho, 2014.



Figura 11. Obtención del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*) y aceite esencial en frasco de color ámbar para su conservación. Ayacucho, 2014.



ANEXO 4

Tabla 9. Resultados de las características organolépticas del aceite esencial de cáscara de naranja *Citrus aurantium* L. Ayacucho, 2014.

Características organolépticas del aceite esencial de cáscara de naranja <i>Citrus aurantium</i> L.	
Característica	Descripción
Aspecto	Líquido y viscoso
Color	Incoloro
Olor	Característico (muy pronunciado)
Sabor	Característico (ácido)

ANEXO 5

Tabla 10. Resultados de las constantes fisicoquímicas del aceite esencial de cáscara de naranja *Citrus aurantium* L. Ayacucho, 2014.

Características fisicoquímicas	Valores
Densidad	0,850 g/mL
Índice de refracción	1,472
Índice de acidez	1,4025 mg KOH/ g aceite

ANEXO 6

Cálculo del rendimiento de aceite esencial a partir de cáscara de naranja

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{W_2}{W_1} \times 100$$

w_1 : Masa cáscara de naranja (g)

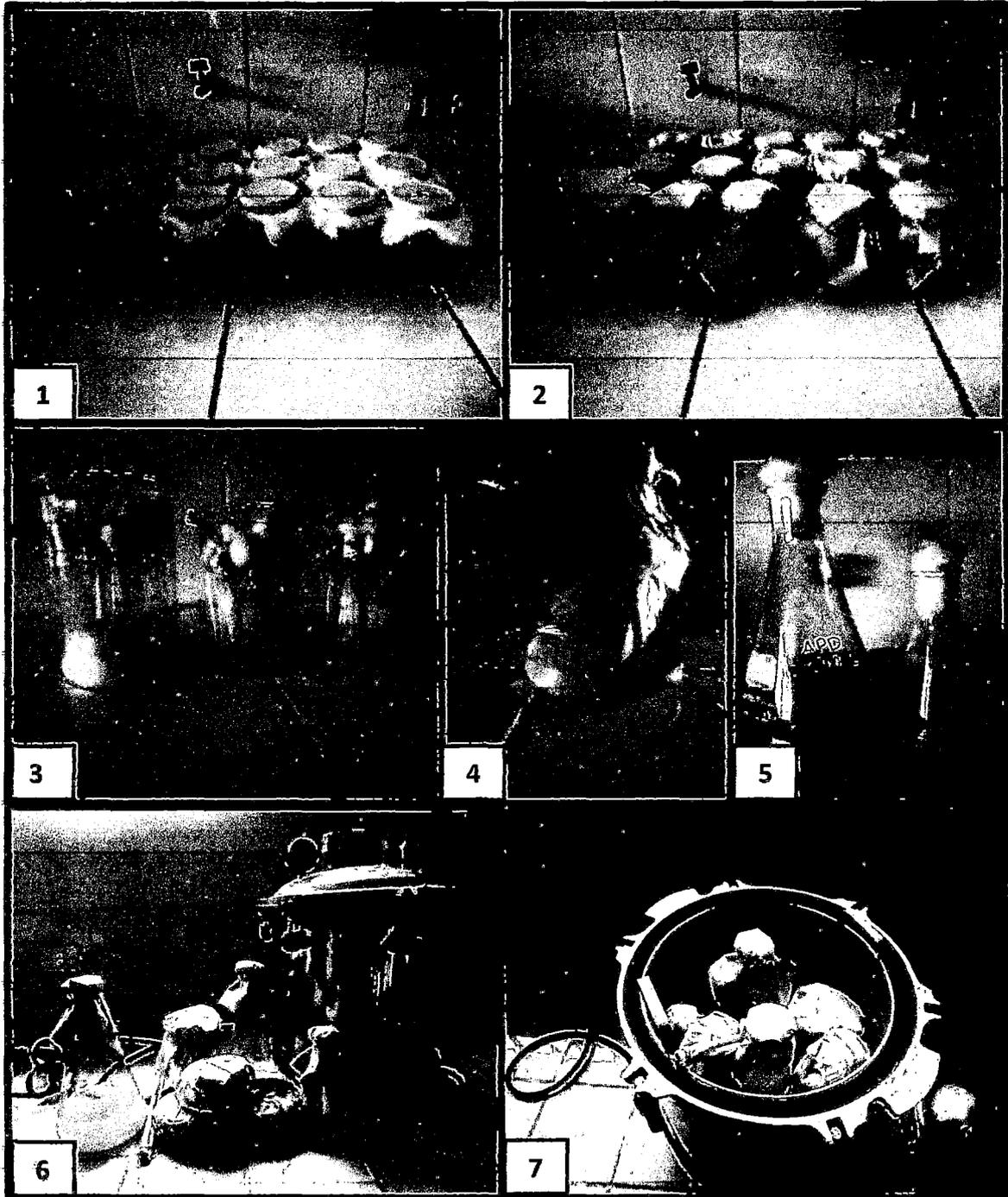
w_2 : Masa aceite esencial (g)

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{35,7 \text{ g aceite esencial}}{5000 \text{ g cáscara de naranja}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 0,71\%$$

ANEXO 7

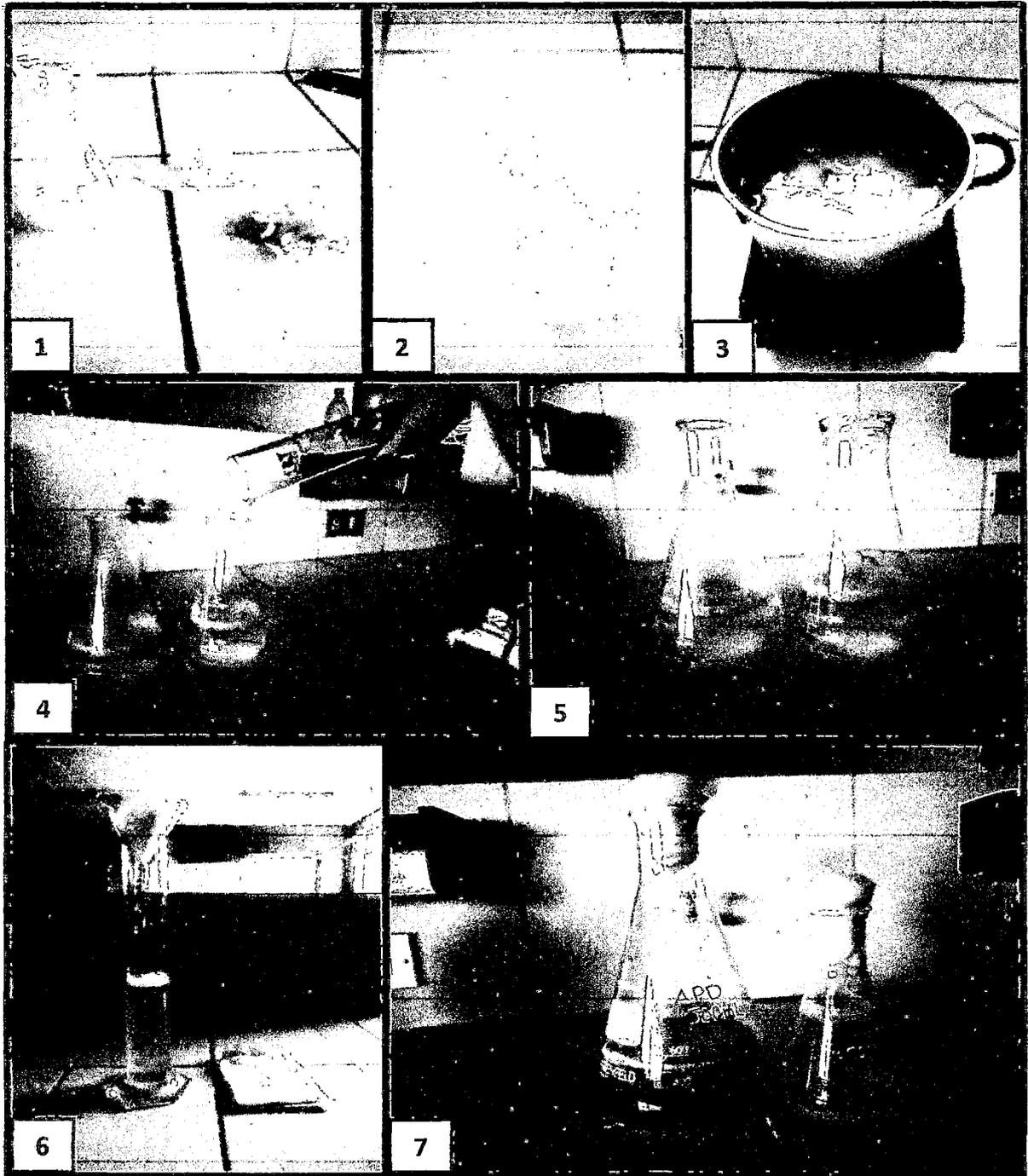
Figura 12. Preparación y esterilización de materiales y medios de cultivo. Ayacucho, 2014.



(1)Frascos para dilución; (2)Sellado de frasco para esterilización; (3)Sellado de tubos de ensayo para preparación de CMI; (4)Sellado de Caldo Papa Dextrosa; (5)Sellado de los medios de cultivo para esterilización; (6)Materiales listos para ser esterilizados; (7)Materiales colocados al autoclave.

ANEXO 8

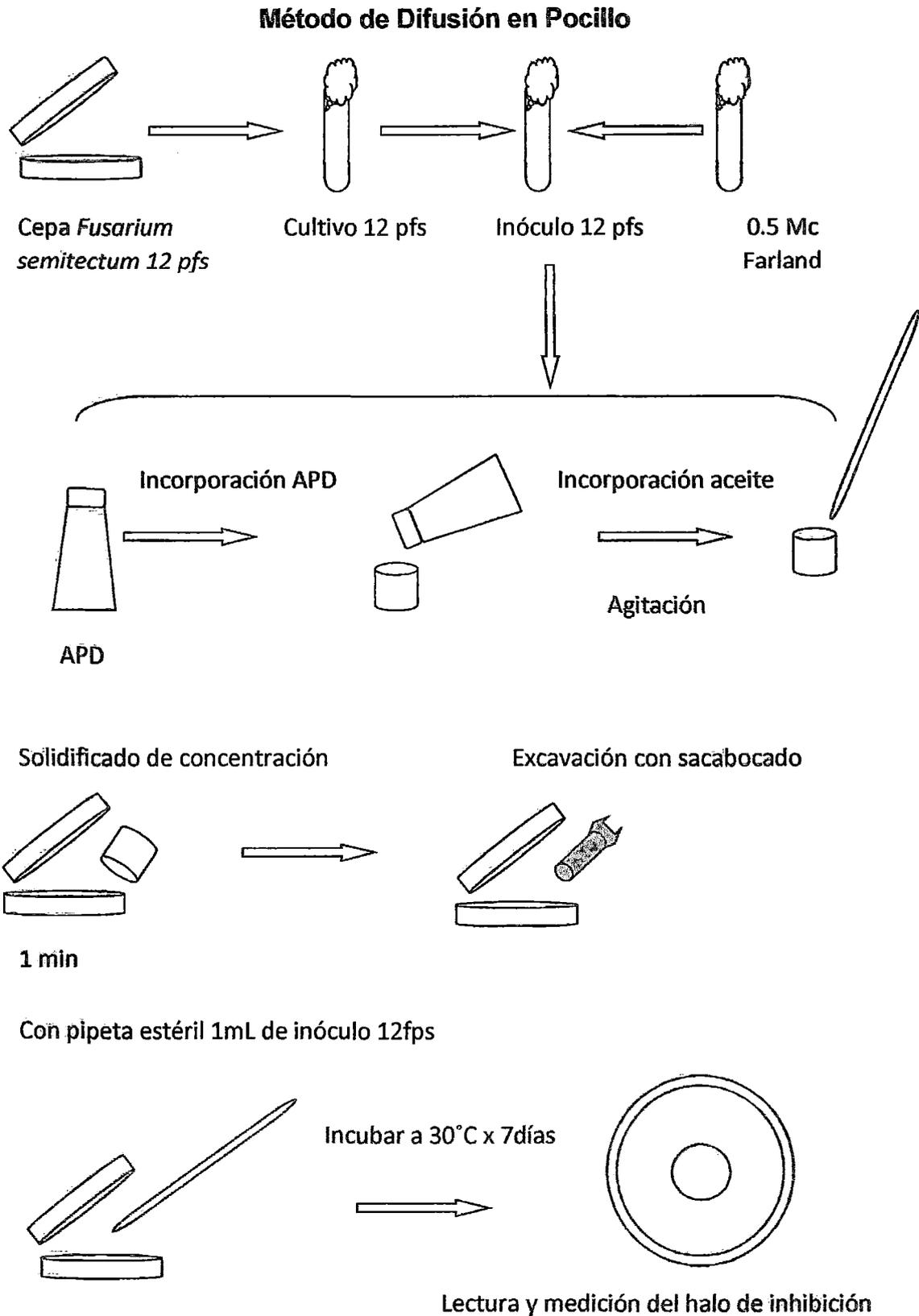
Figura 13. Preparación de los medios de cultivo de Agar Papa Dextrosa (APD) y Caldo Papa Dextrosa (CPD).Ayacucho, 2014.



(1)Pelado de la papa; (2) Troceado de la papa;(3) Extracción del almidón;(4,5) Vaciado del almidón;(6) Filtrado del almidón;(7) Preparación de los medios de cultivo.

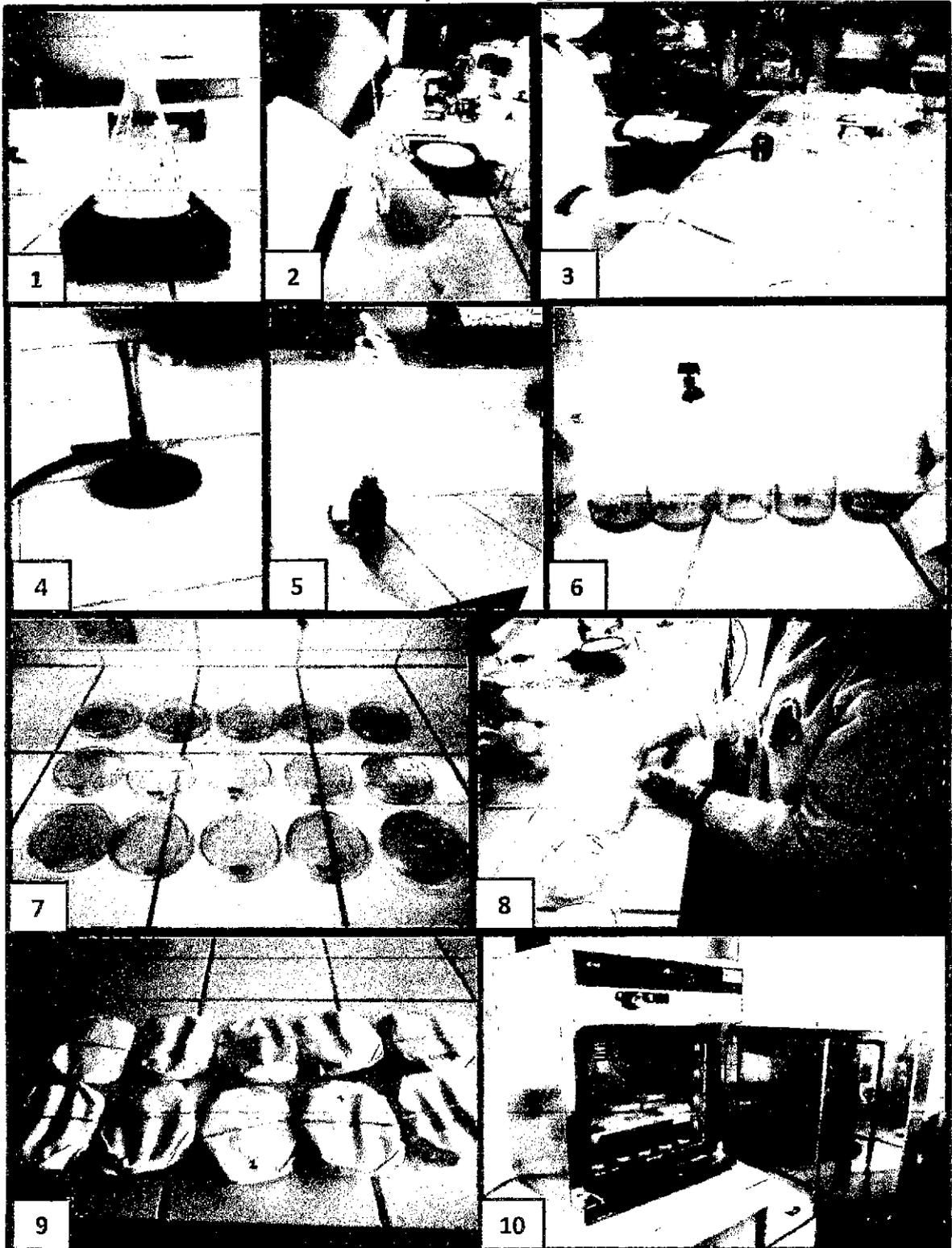
ANEXO 9

Figura 14. Esquema de siembra del Método de Difusión en Pocillo. Ayacucho, 2014.



ANEXO 10

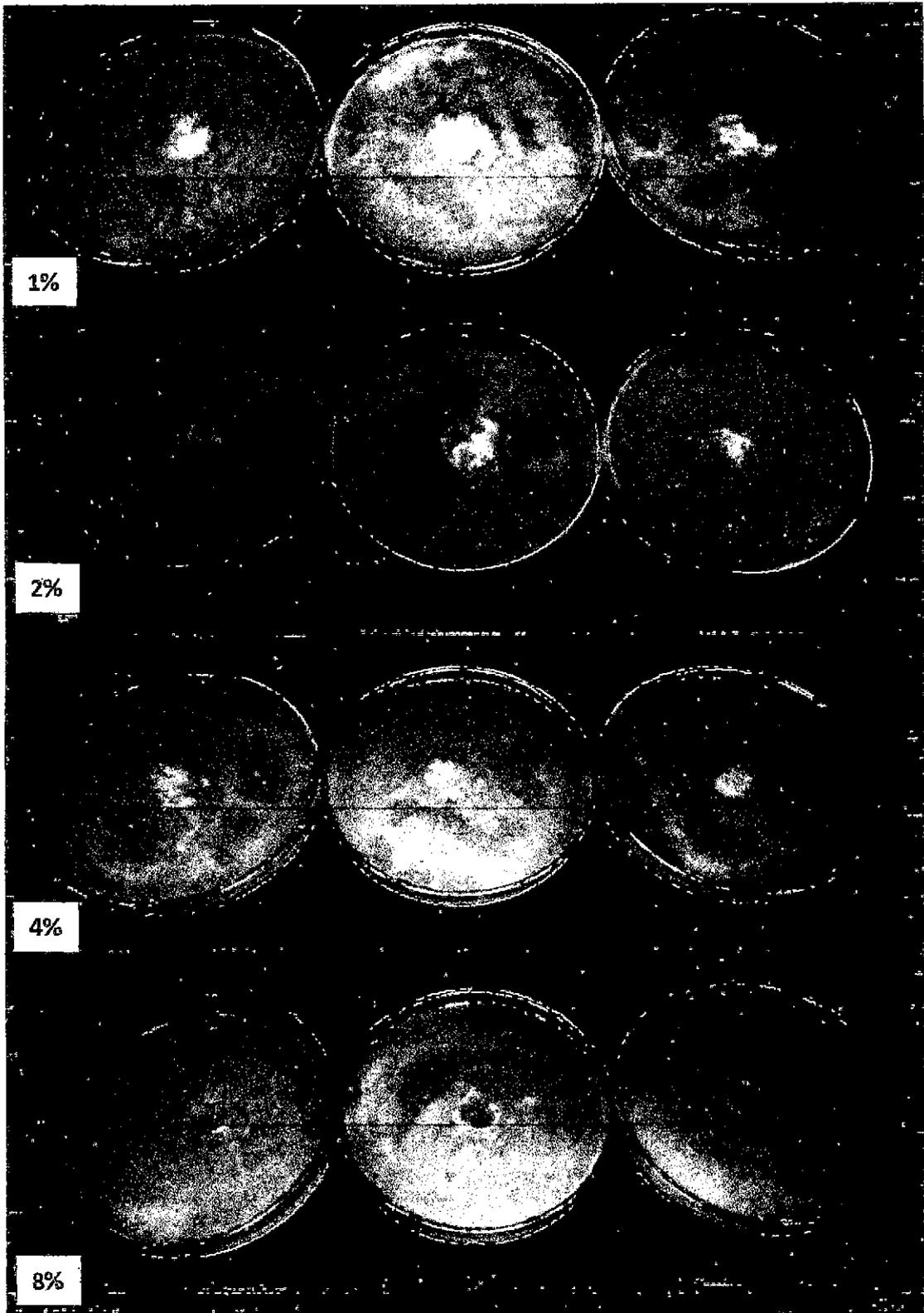
Figura 15. Preparación de las diferentes concentraciones del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium* L.) y procedimiento de siembra del método difusión en pocillo. Ayacucho, 2014.



(1)Calentamiento del agar; (2, 3,4)Agregando 40mL de agar; (5) Vertiendo 1mL de inóculo; (6)Dilución del aceite y agar; (7)Placas contenidas con la dilución; (8,9)Cubrimiento de placas; (10)Placas cultivadas en cámara de incubación.

ANEXO 11

Figura 16. Halos de inhibición de las concentraciones de 1%, 2%, 4% y 8% del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium* L.) frente al hongo *Fusarium semitectum* 12pfs. Ayacucho, 2014.



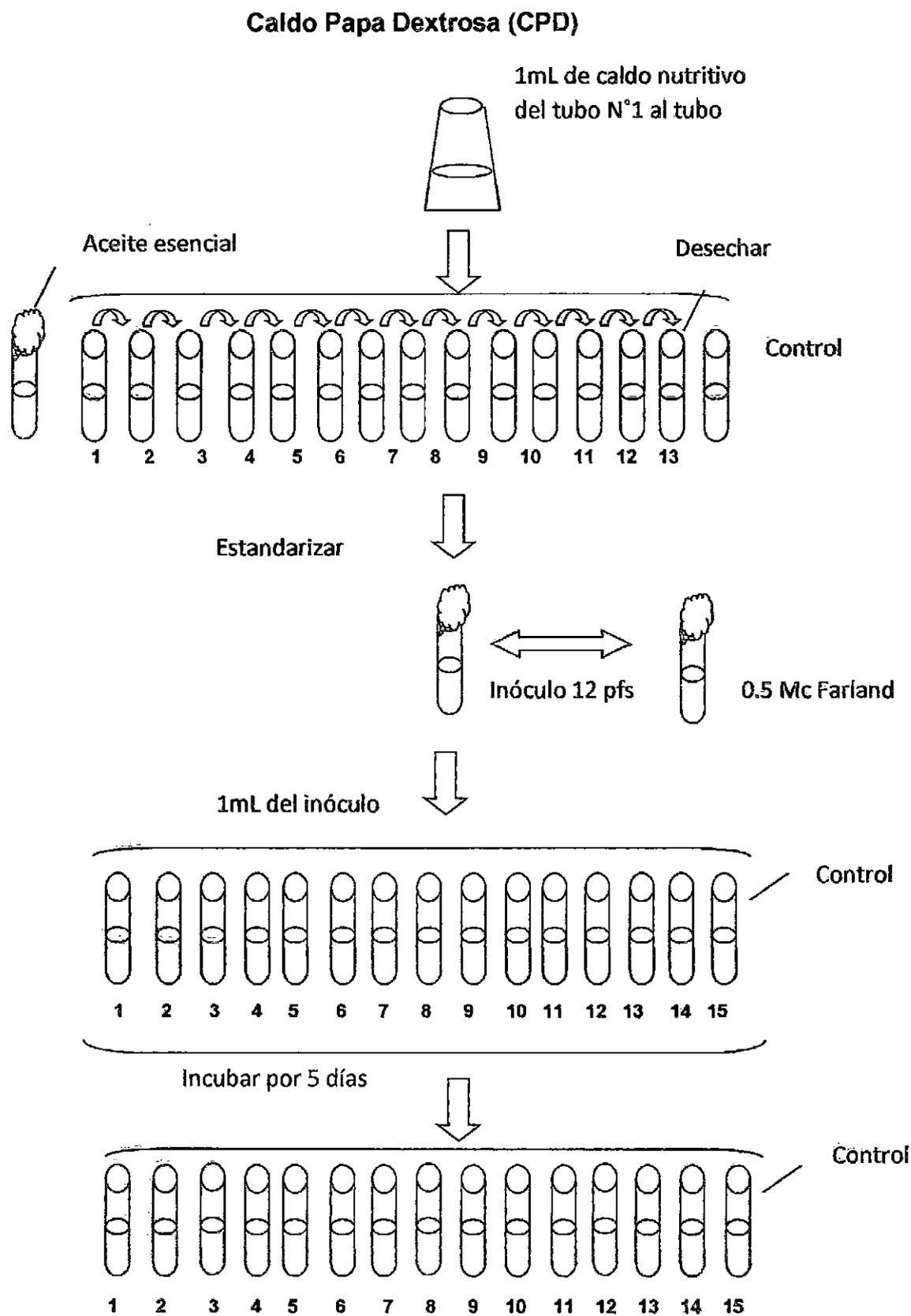
ANEXO12

Figura 17. Halos de crecimiento del hongo *Fusarium semitectum* 12pfs, usado en el control. Ayacucho, 2014.



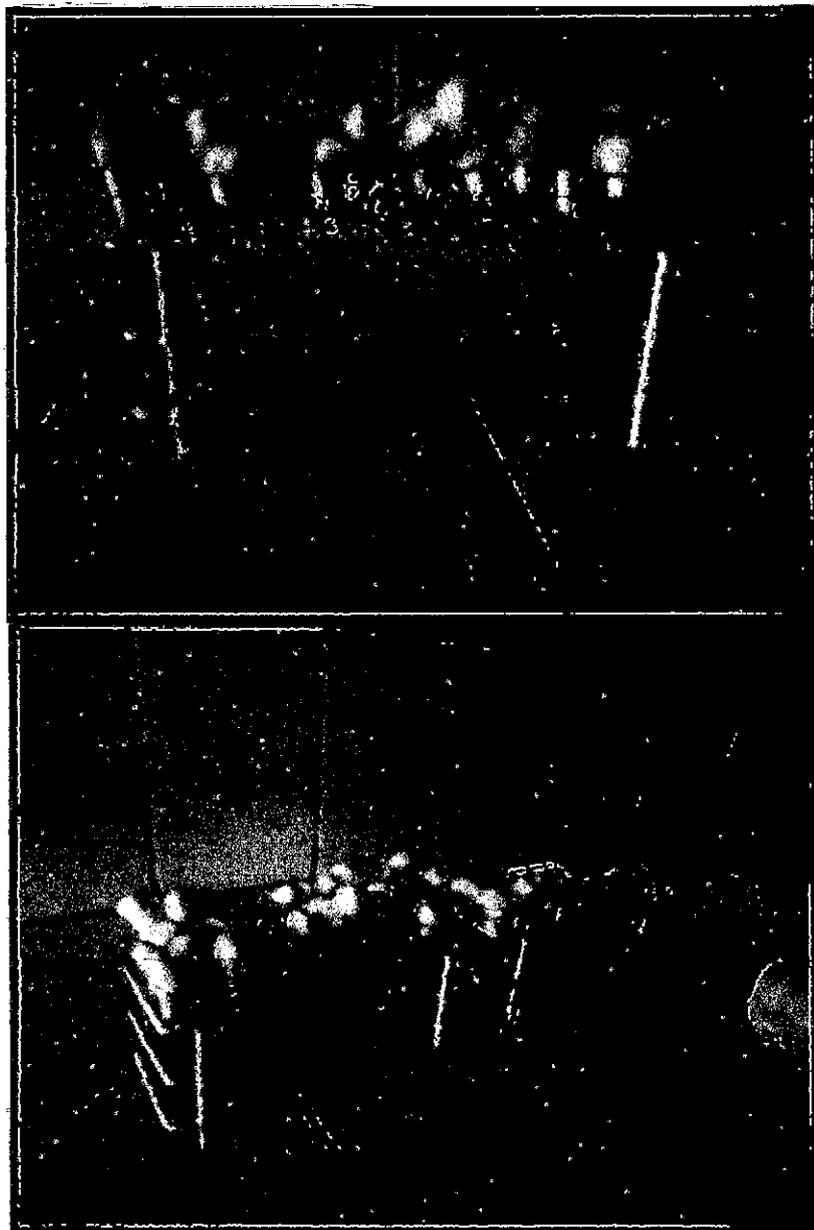
ANEXO 13

Figura 18. Protocolo para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Ayacucho, 2014.



ANEXO14

Figura 19. Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las concentraciones de 1%, 2% y 4% del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*). Ayacucho, 2014.



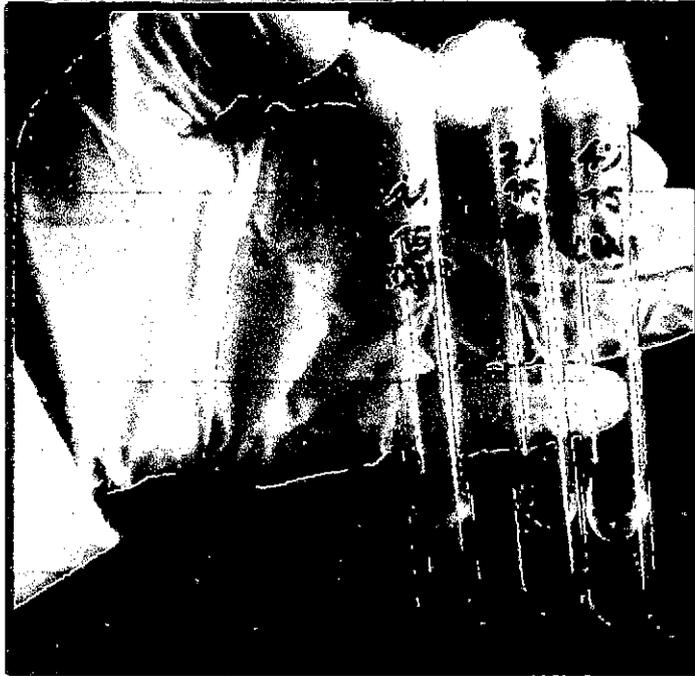
ANEXO 15

Figura 20. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las concentraciones 1%, 2%, 4%, respectivamente. Ayacucho, 2014.



ANEXO 16

Figura 21. Crecimiento de *Fusarium semitectum*12pfs del control usado en la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las concentraciones 1%, 2%, 4%, respectivamente. Ayacucho, 2014.



ANEXO 17

Tabla 11. Datos descriptivos de los halos de inhibición del efecto antifúngico del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*) frente a *Fusarium semitectum* 12 pfs. Ayacucho, 2014.

Halo de inhibición(mm)/tratamientos							
Columna1		Columna2		Columna3		Columna4	
Media	88.074074	Media	43.592593	Media	22.000000	Media	12.000000
Error típico	3.720248	Error típico	2.094804	Error típico	1.186342	Error típico	0.947331
Mediana	86.000000	Mediana	44.000000	Mediana	21.000000	Mediana	11.000000
Moda	100.000000	Moda	36.000000	Moda	22.000000	Moda	11.000000
Desv. estándar	19.330975	Desv. estándar	10.884920	Desv. estándar	6.164414	Desv. estándar	4.922476
Var. de la muestra	373.686610	Var. de la muestra	118.481481	Var. de la muestra	38.000000	Var. de la muestra	24.230769
Curtosis	-0.342077	Curtosis	-0.238421	Curtosis	-0.600241	Curtosis	-0.228800
Coef. de asimetría	0.406378	Coef. de asimetría	0.607584	Coef. de asimetría	0.521342	Coef. de asimetría	0.959099
Rango	76.000000	Rango	38.000000	Rango	19.000000	Rango	15.000000
Mínimo	57.000000	Mínimo	29.000000	Mínimo	14.000000	Mínimo	7.000000
Máximo	133.000000	Máximo	67.000000	Máximo	33.000000	Máximo	22.000000
Suma	2378.000000	Suma	1177.000000	Suma	594.000000	Suma	324.000000
Cuenta	27.000000	Cuenta	27.000000	Cuenta	27.000000	Cuenta	27.000000
Mayor (1)	133.000000	Mayor (1)	67.000000	Mayor (1)	33.000000	Mayor (1)	22.000000
Menor(1)	57.000000	Menor(1)	29.000000	Menor(1)	14.000000	Menor(1)	7.000000
N.C.(95.0%)	7.647079	N.C. (95.0%)	4.305931	N.C. (95.0%)	2.438561	N.C. (95.0%)	1.947267

ANEXO 18

Tabla 12. Datos descriptivos de los porcentajes de inhibición del efecto antifúngico del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*) frente a *Fusarium semitectum*12pfs. Ayacucho, 2014.

% de inhibición/tratamientos									
CONTROL		C1%		C2%		C4%		C8%	
Media	11.222222	Media	9.666667	Media	4.777778	Media	2.444444	Media	1.333333
Error típico	0.571979	Error típico	0.408248	Error típico	0.277778	Error típico	0.175682	Error típico	0.166667
Mediana	11.000000	Mediana	9.000000	Mediana	5.000000	Mediana	2.000000	Mediana	1.000000
Moda	9.000000	Moda	9.000000	Moda	4.000000	Moda	2.000000	Moda	1.000000
Desv. Están.	1.715938	Desv. Están.	1.224745	Desv. Están.	0.833333	Desv. Están.	0.527046	Desv. Están.	0.500000
Var. de la mu	2.944444	Var. de la m	1.500000	Var. de la m	0.694444	Var. de la m	0.277778	Var. de la m	0.250000
Curtosis	-0.824798	Curtosis	0.349206	Curtosis	-1.275429	Curtosis	-2.571429	Curtosis	-1.714286
Coef. de asim.	0.133519	Coef. de asim.	0.816497	Coef. de asim.	0.500571	Coef. de asim.	0.271052	Coef. de asim.	0.857143
Rango	5.000000	Rango	4.000000	Rango	2.000000	Rango	1.000000	Rango	1.000000
Mínimo	9.000000	Mínimo	8.000000	Mínimo	4.000000	Mínimo	2.000000	Mínimo	1.000000
Máximo	14.000000	Máximo	12.000000	Máximo	6.000000	Máximo	3.000000	Máximo	2.000000
Suma	101.000000	Suma	87.000000	Suma	43.000000	Suma	22.000000	Suma	12.000000
Cuenta	9.000000	Cuenta	9.000000	Cuenta	9.000000	Cuenta	9.000000	Cuenta	9.000000
N.C. (95.0%)	1.318987	N.C. (95.0%)	0.941422	N.C. (95.0%)	0.640557	N.C. (95.0%)	0.405124	N.C. (95.0%)	0.384334

ANEXO 19
Matriz de consistencia

Título	Problema	Objetivos	Marco teórico	Hipótesis	Variables	Metodología
<p>Actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>) frente al hongo <i>Fusarium semitectum</i>.</p>	<p>¿Cuál es la actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>) frente al hongo <i>Fusarium semitectum</i>?</p>	<p>Objetivo general Determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>) frente al hongo <i>Fusarium semitectum</i></p> <p>Objetivos específicos -Extraer el aceite esencial de cáscara de naranja mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor, así como determinar sus características fisicoquímicas y organolépticas.</p> <p>-Conocer la actividad antifúngica a diferentes concentraciones y la concentración óptima antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>), frente al crecimiento de <i>Fusarium semitectum</i>.</p> <p>-Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>), frente al hongo <i>Fusarium semitectum</i>.</p>	<p>2.1.Antecedentes 2.2Aspectos botánicos de la planta - Descripción taxonómica de la naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>). -Descripción botánica de la naranja (<i>Citrus aurantium L.</i>). -Distribución geográfica de (<i>Citrus aurantium L.</i>). 2.3Agentes antimicrobianos 2.4 Aceites esenciales -Propiedades físicas y organolépticas -Composición de los aceites esenciales 2.5Ubicación taxonómica de <i>Fusarium semitectum</i></p>	<p>El aceite esencial de cáscara de naranja <i>Citrus aurantium L.</i> tiene actividad antifúngica sobre <i>Fusarium semitectum</i>.</p>	<p>Variable independiente Aceite esencial de cáscara de naranja <i>Citrus aurantium L.</i></p> <p>Indicadores: Concentraciones, pH, temperatura e inóculo. -1% -2% -4% -8%</p> <p>Variable dependiente: Actividad antifúngica</p> <p>Indicadores: -Halos de inhibición -Concentración Mínima Inhibitoria</p>	<p>Tipo de investigación: Experimental Población: 330 frutos de naranja <i>Citrus aurantium L.</i> Muestra: 5Kg de cáscara de naranja <i>Citrus aurantium L.</i> Unidad experimental: 13 placas de cultivo de <i>Fusarium semitectum</i> 12pfs. Determinación de la actividad antifúngica. La metodología empleada para la determinación de la actividad antifúngica se basó en el método de difusión en pocillo con diferentes concentraciones de aceite esencial. Análisis estadístico Los resultados se procesaron en cuadros mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0.05, para esto se usó el programa SPSS 21.</p>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA ACADÉMICA DE BIOTECNOLOGÍA

Av. Independencia s/n Huamanga Telf. 066-318553, 066-312510 Anexo 145



LA QUE SUSCRIBE, JEFA DEL LABORATORIO DEL ÁREA ACADÉMICA DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA:

CERTIFICA:

Que la cepa **12pfs** corresponde a *Fusarium semitectum*, la cual fue aislada e identificada en base a las claves taxonómicas propuestas por Leonor Carrillo.

La cepa macroscópicamente presenta un micelio denso, algodonoso de color blanco a marrón cuando llega a la esporulación y microscópicamente se observa a las esporas dispersas y en el micelio aéreo y los esporodocios formando masas limosas.

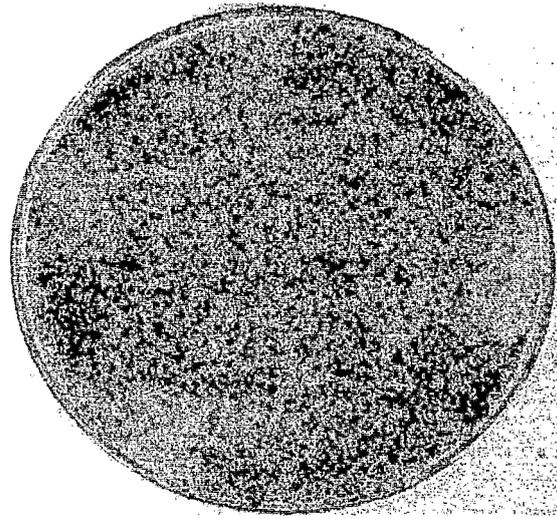
Se expide la presente certificación a solicitud de la interesada para fines que considere pertinentes.

Ayacucho, 20 de julio del 2014

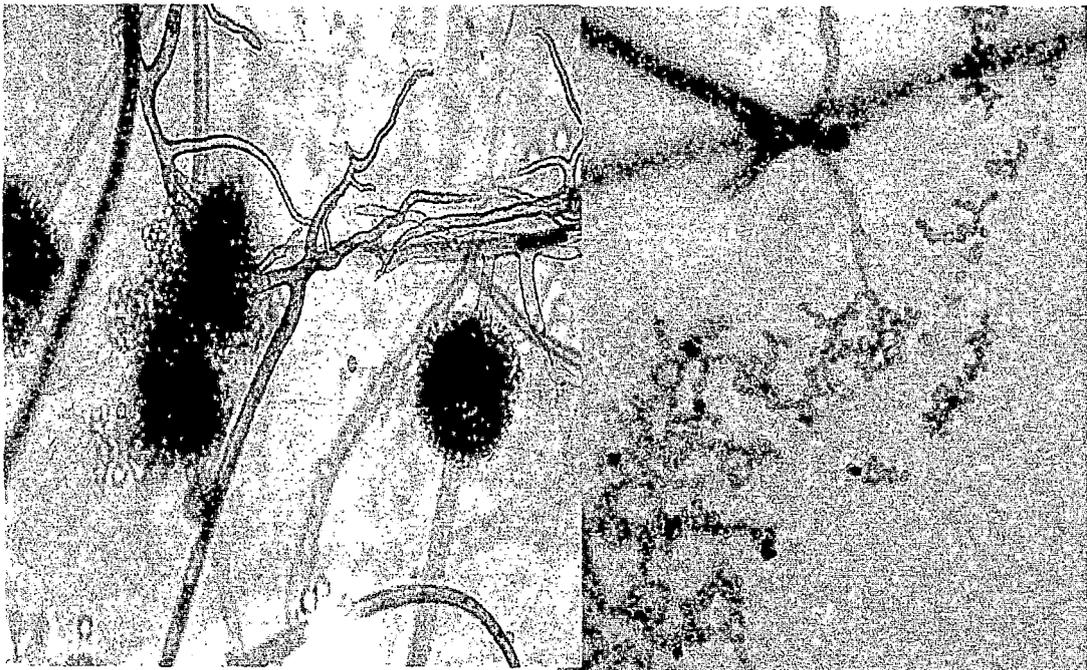


Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga
Facultad de Ciencias Biológicas
Área Académica de Biotecnología
J. García G.
M^{ca} Jhanki García G. Alarcón
JEFE DE LABORATORIO

c.c. Archivo



***Fusarium semitectum* en Agar Papa Dextrosa**



Características microscópicas de *Fusarium semitectum*

MicroBiologics®

RECOMMENDED GROWTH REQUIREMENTS

LYFODISK® AND KWIK-STIK™ Microorganisms

SELECTION OF GROWTH REQUIREMENTS

1. Primary growth on a non-selective agar medium is preferred. Primary growth in a fluid medium should only occur in special instances when recommended. Because of the manipulations required during hydration, it is difficult to obtain purity of a lyophilized strain in a fluid medium. A contaminant may completely overgrow and obscure the presence of the lyophilized strain.
2. The availability of nonselective agar media will differ between laboratories. The following lists alternative agar media selection, if applicable, AND growth requirements selections:

Method 1

- Tryptic Soy Agar, Nonselective Sheep Blood Agar, Standard Plate Count Agar or Nutrient Agar - 35°C in ambient atmosphere - 24 to 48 hours.

Method 2

- Nonselective Sheep Blood Agar - 35°C in ambient atmosphere - 24 to 48 hours.

Method 3

- Chocolate Agar with Hemoglobin/NAD - 35°C in 5% to 10% Carbon Dioxide - 24 to 48 hours.

Method 4

- Anaerobic Blood Agar 35°C in Anaerobic Environment - 48 to 72 hours.
- Some obligate anaerobes may require 5 to 7 days to demonstrate sufficient growth.
- Fresh prepared Nutrient Agar, Tryptic Soy Agar, Standard Plate Count Agar (Standard Methods Agar) are appropriate alternatives for the *Clostridium* species together with an additional period (24 hours) of incubation.

Method 5

- Saboraud Dextrose Emmons Agar - 25°C in ambient atmosphere - 3 to 7 days.
- Nonselective Sheep Blood Agar is an appropriate alternative.
- Nutrient Agar, Tryptic Soy Agar, Potato Dextrose Agar and Standard Plate Count Agar are appropriate alternatives together with an additional period (24 hours) of incubation.

Method 6

- Chocolate Agar w/Hemoglobin/NAD - 35°C in Microaerophilic Environment - 48 to 72 hours.

Method 7

- Lowenstein Jensen Agar or Middlebrook Agar - 35°C in 5-10% CO₂ or ambient atmosphere - up to one week.

Method 8

- Buffered Charcoal Yeast Extract Agar - 35°C in ambient atmosphere - 3 to 5 days.

Method 9

- VAgar or Chocolate Agar - 35°C in 5% to 10% Carbon Dioxide - 48 hours.

Method 10

- Rehydrate in sterile Brain Heart Infusion Broth, Tryptic Soy Broth or 0.85% Saline. Rehydration with water may result in decreased or no recovery. Rehydration with fluid provided in the KWIK-STIK™ unit provides satisfactory recovery.
- Grow on non-selective Sheep Blood Agar or Tryptic Soy Agar - 35°C in ambient atmosphere - 24 to 48 hrs.

Method 11

- The primary growth medium is MRS (Man, Rogosa, Sharpe) Broth. Incubate at 35°C in ambient atmosphere for 48 hours. Transfer to Columbia CNA with Sheep Blood. Incubate at 35°C in 5% Carbon Dioxide for 48 hrs.

Method 12

- Potato Dextrose Agar - 45°C in ambient atmosphere - 48 to 72 hours.

Method 13

- Rehydrate in 10 B Arginine Broth. Make Serial Dilutions. Incubate at 35°C in ambient atmosphere. As soon as the Arginine vial turns pink, sub broth to A-8 Agar. **DONOT** use cotton swabs or woodensh aft. Incubate *Mycoplasma* at 35°C in CO₂. Incubate *Ureaplasma* at 35°C anaerobically.

3. The following information lists the growth requirements for the strains listed:

<i>Acinetobacter</i> sp.	Method 1
<i>Actinobacillus</i> sp.	Method 3
<i>Actinomyces</i> sp.	Method 4
<i>Aerococcus</i> sp.	Method 1
<i>Aeromonas</i> sp.	Method 2
Note: <i>Aeromonas hydrophila</i> should be incubated at 30°C. <i>Aeromonas salmonicida</i> should be incubated at 25°C.	
<i>Alcaligenes</i> sp.	Method 1
<i>Alicyclobacillus</i> sp.	Method 12
<i>Aneurinibacillus</i> sp.	Method 1
<i>Aquaspirillum</i> sp.	Method 1
Note: Incubate at 25°C for 6 days	
<i>Arcanobacterium</i> sp.	Method 2
<i>Arthrobacter</i> sp.	Method 1
Note: Incubate at 25°C.	
<i>Aspergillus</i> sp.	Method 5
<i>Bacillus</i> sp.	Method 1
<i>Bacteroides</i> sp.	Method 4
Note: <i>Bacteroides ureolyticus</i> should be incubated 5 days. The colonies are very small. Several subculture plates may need to be inoculated in order to have sufficient quantity of the microorganism for testing.	
<i>Bifidobacterium</i> sp.	Method 4
<i>Bordetella</i> sp.	Method 3
Note: May require up to 1 week of incubation. May be incubated in Normal Environment.	
Note: <i>Bordetella pertussis</i> (<i>MicroBioLogics Catalog #0843</i>) requires Bordet Gengou with 15% Defibrinated Sheep Blood.	
<i>Brevibacillus</i> sp.	Method 1
<i>Brevundimonas</i> sp.	Method 1
<i>Brochothrix</i> sp.	Method 1
Note: Incubate at 25°C	
<i>Budvicia</i> sp.	Method 1
Note: Incubate at 25°C	
<i>Burkholderia</i> sp.	Method 1
<i>Campylobacter</i> sp.	Method
6 Note: Chocolate agar is the best medium for the primary growth of <i>Campylobacter jejuni</i> . DO NOT open the inoculated agar medium petri plate for the first 48 hours.	
<i>Candida</i> sp.	Method 5
<i>Capnocytophaga</i> sp.	Method 3
<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	Method 1
<i>Chryseobacterium</i> sp.	Method 1
<i>Citrobacter</i> sp.	Method 1
<i>Clostridium</i> sp.	Method
4 Note: <i>Clostridium baratii</i> only grows on Anaerobic Blood Agar	
<i>Corynebacterium</i> sp.	Method 1
<i>Cryptococcus</i> sp.	Method 5
Note: <i>Cryptococcus</i> should be incubated at 25°C to assure growth.	
<i>Deinococcus</i> sp.	Method 1
<i>Deiftia</i> sp.	Method 1
<i>Edwardsiella</i> sp.	Method 1
<i>Eggerthella</i> sp.	Method 4
<i>Eikenella</i> sp.	Method 3
<i>Enterobacter</i> sp.	Method 1
<i>Enterococcus</i> sp.	Method 1

<i>Erysipelothrix</i> sp.	Method 2
<i>Escherichia coli</i>	Method 1
<i>Exiguobacterium</i> sp.	Method 1
<i>Finegoldia</i> sp.	Method 4
Note: Incubate 72 to 96 hours in anaerobic atmosphere.	
<i>Flavobacterium</i> sp.	Method 1
Note: Incubate at 30°C	
<i>Fluoribacter</i> sp.	Method 8
<i>Fusobacterium</i> sp.	Method 4
<i>Gardnerella</i> sp.	Method 9
<i>Gemella</i> sp.	Method 4
<i>Geobacillus</i> sp.	Method 1
Note: <i>Geobacillus stearothermophilus</i> strains must be incubated at 55°C.	
<i>Geotrichum</i> sp.	Method 5
<i>Haemophilus</i> sp.	Method 3
<i>Hafnia</i> sp.	Method 1
<i>Issatchenkia</i> sp.	Method 5
<i>Kingella</i> sp.	Method 2
Note: Incubate in 5-10% CO ₂	
<i>Klebsiella</i> sp.	Method 1
<i>Kloekera</i> sp.	Method 5
<i>Kocuria</i> sp.	Method 1
<i>Lactobacillus</i> sp.	Method 2
Note: <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> and <i>L. gasser</i> must use Method 11.	
<i>Lactococcus</i> sp.	Method 2
<i>Leclercia</i> sp.	Method 1
<i>Legionella</i> sp.	Method 8
<i>Listeria</i> sp.	Method 1
<i>Macrococcus</i> sp.	Method 1
<i>Mannheimia</i> sp.	Method 1
<i>Methylobacterium</i> sp.	Method
1 Note: Incubate at 25°C. Grows best on Standard Plate Count Agar	
<i>Microbacterium</i> sp.	Method 1
Note: Incubate at 30°C	
<i>Micrococcus</i> sp.	Method 1
<i>Micromonas</i> sp.	Method
4 Note: <i>Micromonas micros</i> requires 5 to 7 days of aerobic incubation.	
<i>Microsporium</i> sp.	Method 5
<i>Moraxella</i> sp.	Method 2
<i>Morganella</i> sp.	Method 1
<i>Mycobacterium</i> sp.	Method 7
Note: <i>Mycobacterium gordonae</i> , <i>terrae</i> and <i>tuberculosis</i> may require up to one month incubation.	
<i>Mycoplasma</i> sp.	Method 13
<i>Myroides</i> sp.	Method 2
<i>Neisseria</i> sp.	Method 3
Note: Chocolate agar is the best medium for the initial growth of <i>Neisseria</i> species. DO NOT open the inoculated agar medium petri plate for the first 48 hours.	
<i>Nocardia</i> sp.	Method 1
<i>Novosphingobium</i> sp.	Method 1
Note: Incubate at 25°C.	
<i>Ochrobactrum</i> sp.	Method 1
<i>Oligella</i> sp.	Method 2
<i>Paecilomyces</i> sp.	Method 5
<i>Paenibacillus</i> sp.	Method 1

<i>Pasteurella</i> sp.	Method 2	<i>Vibrio</i> sp.	Method 10
<i>Pediococcus</i> sp.	Method 11	Note: <i>Vibrio alginolyticus</i> should be grown on Columbia Blood Agar or Tryptic Soy Agar	
Note: <i>Pediococcus damnosus</i> must be subcultured to MRS Agar from MRS Broth			
<i>Penicillium</i> sp.	Method 5	<i>Virgibacillus</i> sp.	Method 1
<i>Peptoniphilus</i> sp.	Method	<i>Yarrowia</i> sp.	Method 5
Note: Incubate 72 to 96 hours in an anaerobic atmosphere.			
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	Method 4	<i>Yersinia</i> sp.	Method 1
<i>Plesiomonas</i> sp.	Method 1	<i>Zygosaccharomyces</i> sp.	Method 5
<i>Porphyromonas</i> sp.	Method		
Note: 5 to 7 days of anaerobic incubation is required.			
<i>Prevotella</i> sp.	Method		
Note: 5 to 7 days of anaerobic incubation is required.			
<i>Propionibacterium</i> sp.	Method		
Note: 72 to 96 hours of anaerobic incubation is required.			
<i>Proteus</i> sp.	Method 1		
<i>Prototheca</i> sp.	Method 5		
<i>Providencia</i> sp.	Method 1		
<i>Pseudomonas</i> sp.	Method		
Note: <i>Pseudomonas fluorescens</i> should be incubated at 25° C. <i>Pseudomonas</i> species (<i>MicroBioLogics Catalog #0162</i>) should be incubated at 30° C			
<i>Ralstonia</i> sp.	Method 1		
<i>Raoultella</i> sp.	Method 1		
<i>Rhizopus</i> sp.	Method 5		
<i>Rhodococcus</i> sp.	Method 2		
<i>Rhodotorula</i> sp.	Method 5		
<i>Saccharomyces</i> sp. Method 5 Note: Sabouraud Dextrose Emmons Agar is the best medium for growth of <i>Saccharomyces</i> sp.			
<i>Salmonella</i> sp.	Method 1		
<i>Scopulariopsis</i> sp.	Method 5		
<i>Serratia</i> sp.	Method 1		
<i>Shewanella</i> sp.	Method 10		
<i>Shigella</i> sp.	Method 1		
<i>Sordaria</i> sp.	Method 5		
<i>Sphingobacterium</i> sp.	Method 1		
<i>Sphingomonas</i> sp.	Method 1		
Note: Incubate at 25° C.			
<i>Staphylococcus</i> sp.	Method 1		
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Method 1		
<i>Streptococcus</i> sp.	Method		
Note: <i>Streptococcus cricetus</i> must be incubated in a microaerophilic environment			
<i>Streptomyces</i> sp.	Method		
Note: <i>Streptomyces</i> sp. does not grow on Potato Dextrose Agar			
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	Method 4		
Note: Primary growth medium for <i>T. thermosaccharolyticum</i> (<i>MicroBioLogics Catalog #0728</i>) is Cooked Meat Medium. Incubation at 45° C for 72 hours is required. After initial growth, organism may be grown on Anaerobic Blood Agar which is incubated at 45° C for 72 hours in an anaerobic atmosphere.			
<i>Trichophyton</i> sp.	Method 5		
<i>Trichosporon</i> sp.	Method 5		
<i>Ureaplasma</i> sp.	Method 13		
<i>Veillonella</i> sp.	Method 4		

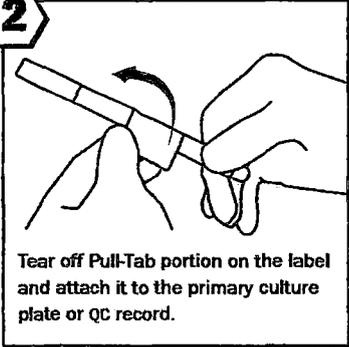
KWIK-STIK™ devices contain a lyophilized pellet of a single strain of microorganism or a defined mixed population of microorganisms. The selection of KWIK-STIK™ microorganisms supports quality assurance programs in microbiology laboratories providing clinical diagnostic services and a wide variety of testing services.

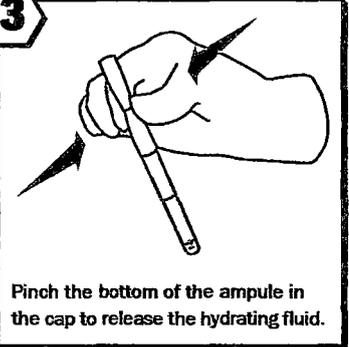


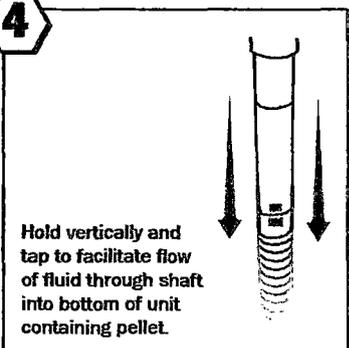
KWIK-STIK™

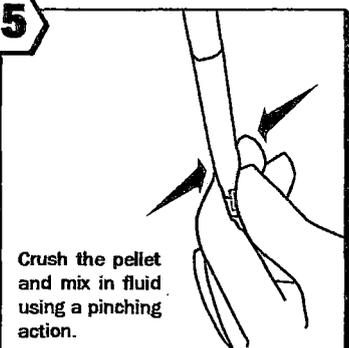
Also for KWIK-STIK™ Plus & EZ-COMPT™
Simply Efficient

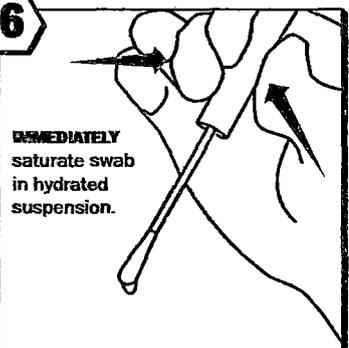
- 

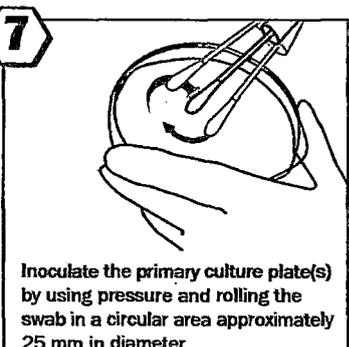
1 Tear open pouch at notch and remove the KWIK-STIK™.
- 

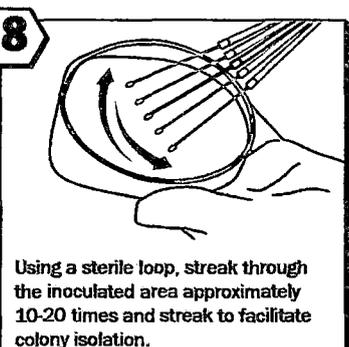
2 Tear off Pull-Tab portion on the label and attach it to the primary culture plate or QC record.
- 

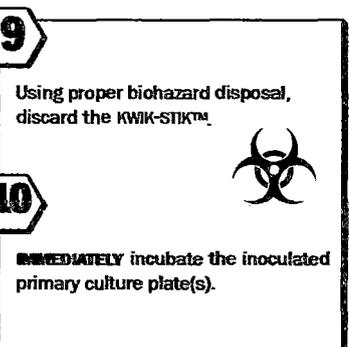
3 Pinch the bottom of the ampule in the cap to release the hydrating fluid.
- 

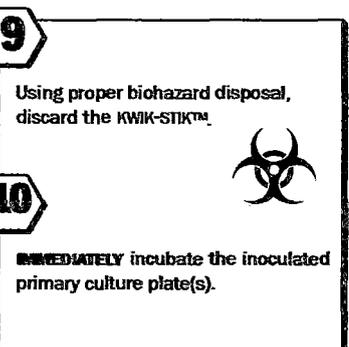
4 Hold vertically and tap to facilitate flow of fluid through shaft into bottom of unit containing pellet.
- 

5 Crush the pellet and mix in fluid using a pinching action.
- 

6 IMMEDIATELY saturate swab in hydrated suspension.
- 

7 Inoculate the primary culture plate(s) by using pressure and rolling the swab in a circular area approximately 25 mm in diameter.
- 

8 Using a sterile loop, streak through the inoculated area approximately 10-20 times and streak to facilitate colony isolation.
- 

9 Using proper biohazard disposal, discard the KWIK-STIK™.
- 

10 IMMEDIATELY incubate the inoculated primary culture plate(s).

MicroBioLogics

BIBLIOTECA E INFORMACION
CULTURAL
U.N.S.C.H.