

# Actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus sinensis*) var. Valencia frente a microorganismos gram positivos y gram negativos

## Antibacterial activity of the essential oil of orange barks (*Citrus sinensis*) var. Valencia against positive and negative gram microorganisms

L. Guerra<sup>1</sup>, L. Soto<sup>1</sup>, Z. Medina<sup>2</sup>, G. Ojeda de R.<sup>1</sup> y J. Peña<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Laboratorio de Alimentos, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia (LUZ). Maracaibo, Venezuela. 4012.

<sup>2</sup>Departamento de Biología, Unidad de Investigaciones de Microbiología Ambiental (UIMA), Facultad Experimental de Ciencias, LUZ.

### Resumen

Se ha demostrado el poder antimicrobiano de aceites esenciales, especialmente los extraídos de frutas cítricas, por lo que constituyen alternativas terapéuticas efectivas contra infecciones producidas por microorganismos patógenos causantes de enfermedades y resistentes a los antibióticos. El objetivo de éste estudio fue obtener mediante el método de hidrodestilación, aceite esencial de las cortezas de naranjas cultivadas en el municipio Bejuma, estado Carabobo, Venezuela y determinar su actividad antibacteriana, frente a los microorganismos gram negativos (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853), y gram positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115), mediante el método de susceptibilidad de difusión en discos de Bauer–Kirby utilizando las siguientes concentraciones de aceite diluidas en etanol: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%. Las cepas gram positivas ensayadas fueron totalmente resistentes al aceite puro. En tanto las cepas gram negativas presentaron sensibilidad a partir de 10%, por lo que se procedió a determinar la concentración inhibitoria mínima mediante el método de dilución en caldo a las cepas sensibles con concentraciones inferiores a las obtenidas en el método antes ensayado (Bauer-Kirby): para las cepas gram negativas utilizándose 5, 6, 7, 8 y 9%. Resultando una CIM para *P. aeruginosa* y *E.*



Recibido el 4-2-2012 ● Aceptado el 6-2-2014

Autor de correspondencia e-mail: laurarsotoa@gmail.com

*coli* de 9 y 10%, respectivamente. Estos datos representan una respuesta a la demanda continua de nuevas alternativas de tratamientos a infecciones producidas por este tipo de microorganismos.

**Palabras clave:** hidrodestilación, naranja y Kirby- Bauer.

## Abstract

It has been proved the antimicrobial power of essential oils, especially those extracted from citrus fruits constituting effective therapeutic alternative against infections caused by pathogenic microorganisms that cause diseases and resistant to antibiotics. The objective of this research was to obtain essential oil of the bark of oranges by hydrodistillation method at Bejuma county Carabobo state, Venezuela and to determine their antibacterial activity against gram-negative microorganisms (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853), and gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115) using the disk diffusion susceptibility method of Bauer-Kirby and the following concentrations of oil diluted in ethanol: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100%. Gram-positive strains tested were completely resistant to pure oil. Both gram-negative strains showed sensitivity from 10%. As proceeded to determine the minimum inhibitory concentration by broth dilution method sensitive strains at concentrations below those obtained in the method already tested (Bauer-Kirby) for gram-negative strains used 5, 6, 7, 8 and 9%. The MIC for *P. aeruginosa* and *E. coli* were 9 and 10%, respectively. These data represent a response to continue the demand for new treatment alternatives for infections caused by these microorganisms.

**Key words:** hydrodistillation, orange and Kirby-Bauer.

## Introducción

La mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), son de origen microbiano, siendo uno de los problemas de salud pública con mayor impacto en el mundo. Debido a que enfermedades tales como: hepatitis A, gastroenteritis, cólera, amibiasis entre otras, se adquieren por el consumo de alimentos y/o aguas contaminadas, es importante considerar la existencia de microorganismos patógenos que son los responsables de ETAs como por ejemplo las causadas por *Staphylococcus aureus* que se producen al consumir alimentos a base

## Introduction

Most of the diseases transmitted by food (ETAs) have a microbial origin, constituting this of t public health problems with big impact worldwide. Since diseases such as: hepatitis A, gastroenteritis, cholera, amebiasis among others, which are acquired by consuming food and/or polluted water; it is important to consider the existence of pathogen microorganisms that are the responsible of ETAs, for example those caused by *Staphylococcus aureus* that produce when eating food produced with polluted milk (Guiza and Rincón, 2007)

de leche contaminada (Guiza y Rincón, 2007).

Aparte de *S. aureus*, existen otros microorganismos como *Escherichia coli*, que produce infecciones del tracto urinario al igual que *Pseudomonas aeruginosa* (Pascual y Calderón, 2000). *Staphylococcus aureus* puede producir una amplia variedad de enfermedades desde infecciones cutáneas hasta enfermedades profundamente arraigadas como osteomielitis, endocarditis y síndrome del shock tóxico, mientras que *Candida albicans*, es la causante de enfermedades como candidiasis genital, candidiasis oral, entre otras (Ingraham y Ingraham, 1998).

La demanda del consumidor por alimentos naturales, con ausencia o reducida cantidad de productos químicos ha ido incrementando notoriamente, lo que hace indispensable la búsqueda de compuestos alternativos y nuevas tecnologías no contaminantes. El control del crecimiento microbiano es uno de los factores más importantes a considerar en la conservación de alimentos, por lo que la sustitución de los productos antimicrobianos químicos por sustancias naturales, como los aceites esenciales, que no alteran las características sensoriales ni nutricionales de los alimentos ha sido revisada por diversos autores desde hace varios años (Velázquez, 2010).

Los aceites esenciales poseen compuestos que exhiben distintos niveles de actividad antibacteriana, son extraídos de diferentes frutos cítricos y plantas aromáticas, su volatilidad a temperatura ambiente, a diferencia de otros agentes antimicrobianos; los hace atractivos para su estudio y aplicación

Besides *S. aureus*, there are microorganisms such as *Escherichia coli*, that produce infections in the urine tract as well as *Pseudomonas aeruginosa* (Pascual and Calderón, 2000). *Staphylococcus aureus* can produce a wide variety of diseases, from dermal infections until diseases deeply rooted such as osteomyelitis, endocarditis, and syndrome of toxic shock; meanwhile *Candida albicans* causes diseases such as genital candidiasis, oral candidiasis, among others (Ingraham and Ingraham, 1998).

The demand of the consumer by natural food with absence or reduced quantity of chemical products has made increased, making essential the search of alternative compounds and new non-polluting technologies. The control of the microbial growth is one of the most important factors to consider in the preservation of food, thus, the replacement of chemical antimicrobial products by natural substances, such as essential oils that do not modify the sensorial and nutritional characteristics of food, has already been revised by different authors (Velázquez, 2010).

The essential oils have compounds that exhibit different levels of antibacterial activity, these are extracted from different citric fruits and aromatic plants, their volatility at environmental temperature, different to other antimicrobial agents; make these oils attractive for their research and application as an adequate and natural alternative of food additives (Agusti, 2003). The essential oils are used as flavoring in the food industry; this characteristic along to the potential flavoring, antimicrobial and

como una alternativa adecuada y natural de aditivos alimentarios (Agusti, 2003). Los aceites esenciales son utilizados como saborizantes en la industria alimenticia, esta característica unida a su potencial saborizante, antimicrobiano y antioxidante, tiene un gran beneficio, por ser un producto natural y sin riesgo a la salud humana (LisBalchin *et al.*, 1998).

Bajo esta concepción se han realizado diversos estudios con aceites esenciales, evaluando su efecto antimicrobiano, fungicida e insecticida (Guiza y Rincón, 2007) con la finalidad de utilizarlos como alternativas terapéuticas contra las infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antibióticos (Hammer *et al.*, 1999). Morales (1996), demostró que el aceite esencial de lima posee una actividad antibacteriana a *Vibrio cholerae*, *Yersenia enterocolitica* y *Streptococcus lactis*. Martínez *et al.*, (2003) por su parte estudiaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina, reportándose que dicho aceite presentó actividad del tipo bactericida contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*.

Según el Instituto Nacional de Estadística de Venezuela para el año 2004 (Anuario de Comercio Exterior, 2004), el país importó 347.497 kilos de aceites esenciales de cítricos, con un costo de 1.199.826 dólares, siendo los países de origen: Brasil, Estados Unidos, Argentina, España, Irlanda, Reino Unido, Alemania, Francia, México, Bélgica y Puerto Rico. Durante ese año, los aceites esenciales de cítricos de mayor demanda fueron los de limón, naranja, lima y mandarina. La producción industrial del aceite esencial

antioxidante, has an excellent benefit, by being a natural product and without any risk to the human health (LisBalchin *et al.*, 1998).

Based on the latter, different research have carried out with essential oils, evaluating their antimicrobial, fungicide and insecticide effect (Guiza and Rincón, 2007) with the aim of using these as therapeutical alternatives against the infections produced by microorganisms resistant to antibiotics (Hammer *et al.*, 1999). Morales (1996) proved that the essential oil of lime has an antibacterial activity against *Vibrio cholerae*, *Yersenia enterocolitica* and *Streptococcus lactis*. On the other hand, Martínez *et al.*, (2003) studied the antibacterial activity of the essential oil of tangerine, reporting that this oil presented a bacterial activity against *B. subtilis*, *S. aureus* and *Listeria monocytogenes*.

According to the National Statistic Institute of Venezuela, in 2004 (Exterior Commerce Yearbook, 2004) the country imported 347.497 kilograms of citric essential oils, with a cost of 1.199.826 dollars, being the origin countries: Brazil, United States, Argentina, Spain, Ireland, United Kingdom, Germany, France, Mexico, Belgium and Puerto Rico. During this year, the essential citric oils with higher demand were those corresponding to lemon, orange, lime and tangerine. The industrial production of essential oil after fruit leftovers contribute to the utilization of the residues, that result into a serious environmental problems, and at the same time, it would allow the

a partir de residuos de frutas contribuye por tanto al aprovechamiento de los desechos que resultan un grave problema ambiental y a su vez le permitiría ahorrar al país divisas que son invertidas en la importación de aceites esenciales (Rojas *et al.*, 2009).

El objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus sinensis*) Variedad Valencia frente a los microorganismos gram negativos (*E. coli* y *P. aeruginosa*) y gram positivos (*S. aureus* y *L. monocytogenes*).

## Materiales y métodos

**Muestra vegetal.** Se utilizaron 90 kg de frutos de Naranjas (*Citrus sinensis*) Variedad Valencia en estado de madurez comercial (índice de madurez  $11,25 \pm 1,93$ ), provenientes de la Finca “Paso Real”, ubicada en el municipio Bejuma, estado Carabobo, Venezuela, cosechados en el mes de febrero de 2011. Las naranjas fueron lavadas, secadas, medidas, pesadas en una balanza (KERN EMB 220-1) y peladas manualmente, utilizando un cuchillo de hoja fina de acero inoxidable; el flavedo se cortó en tiras finas de aproximadamente  $4 \text{ cm}^2$ , almacenándose en bolsas con cierre hermético con capacidad de 500 g para cada bolsa, luego se mantuvieron bajo refrigeración en una cava (Guanche) a  $4^\circ\text{C}$  hasta su análisis. Se obtuvo un total de 12 kg de cortezas de naranja.

**Extracción del aceite esencial.** Se realizó por el método de hidrodestilación (Albado *et al.*, 2001; Alzamora *et al.*, 2001; Acosta *et al.*, 2003; Gende *et al.*, 2007; Gómez,

country to get dollars, which are invested in the importation of essential oils (Rojas *et al.*, 2009).

The aim of this research was to determine the antibacterial activity of the essential oil of orange barks (*Citrus sinensis*) Valencia variety against negative gram microorganisms (*E. coli* and *P. aeruginosa*) and positive gram (*S. aureus* and *L. monocytogenes*).

## Materials and methods

**Vegetal sample.** 90 kg of orange fruits (*Citrus sinensis*) were used from the variety Valencia, under a commercial ripening phase (ripening index  $11.25 \pm 1.93$ ), coming from the farm “Paso Real”, located at Bejuma county, Carabobo state, Venezuela, and cropped in February 2011. The oranges were washed, dried, measured and weighted in a balance (KERN EMB 220-1) and peeled manually, using a stainless steel knife; the rind was cut in fine stripes of approximately  $4 \text{ cm}^2$ , stored in plastic bag hermetically sealed with capacity of 500g each bag, later, were kept refrigerated in a freezer at  $4^\circ\text{C}$  until their analysis. A total of 12 kg of orange barks were obtained.

**Extraction of the essential oil.** The extraction was carried out by hydrodistillation (Albado *et al.*, 2001; Alzamora *et al.*, 2001; Acosta *et al.*, 2003); Gende *et al.*, 2007; Gómez, 2008). The distillation was performed generating vapor at  $90^\circ\text{C}$  for 3 hours in a rounded-base balloon of 2L, that contained on its interior 300 g of rind and water, until covering the sample (approximately 400 mL). The condensed volatile oil was decanted

2008). La destilación se llevó a cabo generando vapor a 90°C por un período de 3 horas en un balón de base redonda de 2 L que contenía en su interior 300 g de flavedo y agua hasta cubrir la muestra (aproximadamente 400 mL). El aceite volátil condensado fue decantado del extracto; para la separación de la emulsión del aceite esencial se llevó a temperaturas bajo -15°C en un freezer (Elextrolux) en un tiempo de 24 horas, quedando el aceite en la parte superior del tubo de ensayo color ámbar y el agua se congela en la parte inferior. Posteriormente, se envasó herméticamente el aceite esencial y se almacenó por debajo de 0°C en una nevera (Admiral) hasta su análisis.

#### **Bacterias utilizadas:**

*Escherichia coli* cepa ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* cepa ATCC 27853 y *Listeria monocytogenes* cepa ATCC 19115. Las cepas bacterianas fueron cultivadas y mantenidas en el Laboratorio de Alimentos, del Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia hasta su uso. Las bacterias fueron reactivadas en caldo nutritivo (Himedia, India) y colocadas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se sembraron en agar nutritivo (Himedia, India) a 37°C durante 24 horas. Se emplearon cepas procedentes del Centro de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo, estado Zulia.

**Actividad antibacteriana del aceite esencial de las cortezas de naranja.** Utilizando el método de suspensión directa de colonias el inóculo de prueba se preparó y se estandarizó por turbidimetría, hasta una turbidez

from the extract; the division of the emulsion of the essential oil was done at a temperature of -15°C in a freezer (Elextrolux) for 24 hours, leaving the oil in the superior part of the amber tube, and the water freezes in the inferior part. Subsequently, the essential oil was bottled hermetically and stored at 0°C in a refrigerator (Admiral), until the analysis.

**Bacteria used.** *Escherichia coli* strain ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* strain ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 27853 and *Listeria monocytogenes* strain ATCC 19115. The bacterial strains were cultivated and kept in the Food Laboratory of the Chemistry Department, Science Experimental Faculty, Universidad del Zulia, until their use. The bacteria were reactivated in a nutritive mean (Himedia, India), at 37°C for 24 hours. Later, were cultivated in nutritive agar (Himedia, India) at 37°C for 24 hours. All the strains came from the Bacteriological Reference Center of Hospital Universitario, Zulia state.

**Antibacterial activity of the essential oil of orange barks.** The test inoculums prepared using the direct colony suspension method, and standardized by turbidimetry, until reaching a similar turbidity at 0.5 on the scale of McFarland (approximately  $1.5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) with sterile saline solution (0.85%) (Cavallieri *et al.*, 2005; CLSI, Document M100-S21, 2011). The following concentrations of essential oil were prepared 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100% employing ethanol as dilution solvent (Riedel Haën, Germany) according to

similar al 0,5 de la escala de McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) con solución salina estéril (0,85%) (Cavallieri *et al.*, 2005; CLSI, Documento M100-S21, 2011). Se prepararon las siguientes concentraciones del aceite esencial 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100% empleando etanol como solvente de dilución (Riedel Haën, Alemania) de acuerdo a la metodología descrita por Martínez *et al.*, (2003).

Para la evaluación de la actividad antibacteriana del aceite se siguió la técnica de difusión en agar, en placas por triplicado, que contenían aproximadamente 20 mL (4 mm de espesor) de agar Mueller – Hinton (Himedia, India), el cual fue inoculado con un cultivo fresco bacteriano, sumergiendo en el medio, un hisopo de algodón estéril que se presionó fuertemente con las paredes del tubo de ensayo para evitar los excesos de inóculo. Luego se inoculó toda la superficie de la placa de agar con el hisopo tres veces y con rotaciones de 60° entre cada inoculación, de esta forma se garantizó la distribución homogénea del microorganismo en el medio. Una vez inoculada la placa se permitió que el inóculo se absorbiera, dejando la misma en reposo por 3 a 15 minutos (sin exceder el tiempo predeterminado). Posteriormente, con ayuda de una pinza previamente esterilizada se dispensaron en cada placa 5 discos con papel filtro Whatman N° 40 previamente esterilizados (15 lbs. de presión a 121°C durante 15 minutos) e impregnados con las concentraciones de aceite esencial indicadas anteriormente (10 – 100%). Luego las placas fueron incubadas a 37°C en atmósfera aeróbica por 24 horas. Se realizaron controles de

the methodology described by Martínez *et al.*, (2003).

For evaluating the antibacterial activity of the oil, the agar diffusion technique was used in plates by triplicate, which had approximately 20 mL (4 mm of thickness) of agar Mueller – Hinton (Himedia, India), which was inoculated with a fresh bacterial culture, immersed in the media using a sterile cotton swab, which pressed strongly with the walls of the tube to avoid the excess of the inoculums. Later, the agar surface inoculated with a swab three times, and with rotations of 60° between each inoculation, guaranteeing the homogeneous distribution of the microorganism in the media. Once inoculated the plate, it was allowed that the inoculums absorbed, leaving the mix to set from 3 to 15 minutes (without exceeding the predetermine time). Subsequently, using a previously sterilized clamp, 5 discs were put on each plate with filtered paper Whatman N° 40, previously sterilized (15 lbs. of pressure at 121°C for 15 minutes) and permeated with the essential oil concentrations already indicated (10-100%). Later, the plates were incubated at 37°C in aerobic environment for 24 hours. Bacterial growth controls and solvent controls were carried out, using for the preparation of the samples (ethanol) and the extraction of the oil (hexane). The antibacterial activity determined measuring the inhibition halo around each hole, considering inhibitory a value of e" 1 mm (Burt, 2004).

**Minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oil of orange.** The broth

crecimiento bacteriano y de los solventes empleados para la preparación de las muestras (etanol) y la extracción del aceite (hexano). La actividad antibacteriana se determinó midiendo el halo de inhibición alrededor de cada orificio, considerando inhibitorio un valor  $e^{\circ}$  1 mm (Burt, 2004).

**Concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite esencial de naranja.** Se utilizó el método de dilución en caldo por triplicado, en tubos de ensayos con 9,8 mL de caldo tripticasa soya (Himedia, India). Utilizando una micropipeta (Boeco 100 – 1000  $\mu$ L) se agregaron 100  $\mu$ L de las diferentes concentraciones del aceite esencial seleccionadas previamente en base a los resultados obtenidos en la prueba de susceptibilidad de difusión en discos Kirby – Bauer (5, 6, 7, 8, 9 y 10%) para *E. coli* ATTC 35218 y *P. aeruginosa* ATTC 27853, los tubos fueron inoculados con 100  $\mu$ L de los microorganismos antes mencionados que resultaron ser sensibles en la prueba anterior, este inóculo fue previamente estandarizado. Luego se incubaron a 37° C durante 24 horas en una incubadora (Memert 854 Schwabach, Alemania), para luego evaluar la inhibición y determinar la concentración más baja a la cual el aceite esencial inhibe el crecimiento microbiano.

**Análisis estadístico.** El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA), utilizando el programa SAS versión 9.1.3, con el fin de determinar diferencias significativas entre las diferentes concentraciones del aceite esencial de naranja sobre las cepas *Escherichia coli* ATTC 35218 y *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 que presen-

dilution method was used by triplicate, in tubes containing 9.8 mL of trypticase soy agar (Himedia, India). 100  $\mu$ L of the different concentrations of the essential oil were added using a micropipette (Boeco 100 – 1000  $\mu$ L), and selected previously based on the results obtained in the diffusion sensitivity test in Kirby discs – Bauer (6, 6, 7, 8, 9 and 10%) for *E. coli* ATTC 35218 and *P. aeruginosa* ATTC 27853, the tubes were inoculated with 100  $\mu$ L of the microorganisms already mentioned, which resulted to be sensitive in the previous test, and this inoculum was previously standardized. Later, were incubated at 37°C for 24 hours in an incubator (Memert 854 Schwabach, Germany), in order to evaluate the inhibition and determine the lowest concentration, where the essential oil inhibits the microbial growth.

**Statistical analysis.** The statistical analysis was performed with the variance analysis (ANOVA), using the software SAS, version 9.1.3, with the aim of determining significant differences among the different concentrations of the orange essential oil on the strains *Escherichia coli* ATTC 35218 and *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853, which presented sensitivity in the disk diffusion test, Kirby-Bauer.

## Results and discussion

**Yield of the essential oil of orange.** 52.5 mL of essential oil was obtained after 12 kg of rind. These values indicate a yield of 1.31 mL of essential oil per each 300 g of rind (4.36 mL. kg<sup>-1</sup> of rind), with a three-hour



taron sensibilidad en la prueba de difusión en discos, Kirby – Bauer.

## Resultados y discusión

**Rendimiento de aceite esencial de naranja.** A partir de 12 kg de flavedo se obtuvo 52,5 mL de aceite esencial. Estos valores indican un rendimiento de 1,31 mL de aceite esencial por cada 300 g de flavedo (4,36 mL.kg<sup>-1</sup> de flavedo), con un proceso de destilación de tres 3 horas, lo cual representa un rendimiento final de 0,58 mL de aceite de naranja.kg<sup>-1</sup> de fruto. La proporción encontrada es óptima para procesos industriales de extracción de aceites esenciales de cítricos, cuyos rendimientos por el método de hidrodestilación oscilan entre 0,01 hasta 0,5 mL de aceite.kg<sup>-1</sup> de flavedo y particularmente para naranja oscilan entre 0,5 y 0,8%, dependiendo de la variedad y madurez de la fruta, equipo y método de extracción, preparación de la muestra y solventes utilizados (Moreno *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos son superiores a los reportados por Soto (2010), con un 0,30 mL de aceite.kg<sup>-1</sup> de flavedo de toronja, empleando el mismo método de obtención del establecido en este trabajo.

**Actividad antibacteriana del aceite esencial de naranja.** El aceite esencial ensayado fue resistente a todas las bacterias gram positivas estudiadas, probablemente se deba a que la pared celular está compuesta básicamente por peptidoglicano que representa hasta el 90% de la pared, ácidos teicoicos que también suelen estar presentes en pequeñas cantidades y polisacáridos; en la pared celular de las gram negativas el peptidoglicano cons-

distillation process, which represents a final yield of 0.58 of orange oil. kg<sup>-1</sup> of the fruit. The proportion found is optimum for industrial extracting processes of essential oils of citric, which yields by the hydrodistillation method oscillate from 0.01 to 0.5 mL of oil. kg<sup>-1</sup> of the rind, and particularly for orange it oscillates from 0.5 to 0.8%, depending on the variety and ripening of the fruit, equipment and extraction method, preparation of the sample and solvents used (Moreno *et al.*, 2004). The results obtained are superior to those reported by Soto (2010), with 0.30 mL of oil. kg<sup>-1</sup> of grapefruit rind, using the same obtaining method established for the current research.

**Antibacterial activity of the essential oil of orange.** The essential oil used was resistant to all the positive gram bacteria studied, maybe due to the fact that the cellular wall is basically composed by peptidoglycan, that represents even 90% of the wall, teichoic acids that are normally present in small quantities and polysaccharides; in the cellular wall of the negative gram the peptidoglycan only constitutes 10%, also, it has 3 polymers located out of the peptidoglycan coating: lipoprotein, external membrane and lipopolysaccharides, the latter has a content of A lipid that might favor the entrance by dilution (hydrophobic) of the essential oil and causes the cellular death by destabilization of the external membrane and the plasmatic membrane by high phospholipids contents.

This A lipid is not present in the positive gram bacteria, and it might be a probable cause of the effect of the

tituye solo el 10%, además poseen 3 polímeros que se encuentran fuera de la envoltura de peptidoglicano: lipoproteína, membrana externa y lipopolisacáridos, este último con un contenido de lípido A que pudiera favorecer la entrada, por disolución (hidrofóbico), del aceite esencial y provocar la muerte celular por desestabilización de la membrana externa y la membrana plasmática, por altos contenidos de fosfolípidos. Este lípido A no está presente en la bacterias gram positivas y este sería una causa probable del efecto del aceite en los diferentes grupos bacterianos, donde las bacterias gram negativas son relativamente más sensibles. El carácter hidrofóbico del aceite esencial de naranja, le permite atravesar la pared celular de bacterias gram negativas a través de canales compuestos por unas proteínas llamadas porinas, estas se encuentran en la membrana externa y facilitan el transporte de nutrientes y sustancias de bajo peso molecular dentro de la célula, incluyendo agentes antimicrobianos, por lo que puede atribuirse la resistencia de las bacterias gram positivas a la carencia de estos canales. (Jeongmok *et al.*, 1995; Consentino *et al.*, 1999).

Los componentes de los aceites esenciales podrían ejercer actividad antibacteriana por interferir en la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular causando el incremento de su permeabilidad y pérdida de los constituyentes celulares, ya que destruye el sistema de enzimas incluyendo las que implican la producción de energía celular (fuerza motriz de protones) y de respiración bacteriana, cuando se trata de concentraciones bajas de los acei-

oil in the different bacterial groups, where the negative gram bacteria are relatively more sensitive. The hydrophobic aspect of the essential orange oil allows it to penetrate the cellular wall of the negative gram bacteria through compound channels, by a protein called porin, which is located on the external membrane and facilitates the transport of nutrients and substances with low molecular weight inside the cell, including antimicrobial agents, thus, the resistance to the positive gram bacteria can be attributed to the lack of these channels (Jeongmok *et al.*, 1995; Consentino *et al.*, 1999).

The components of the essential oils might have antibacterial activity by interfering in the bilayer of phospholipids of the cellular membrane, causing the increment of its permeability and loss of the cellular constituents, since these destroy the enzyme systems including those that implicate the production of cellular energy (driving force of protons) and bacterial breathing, when it is about low concentrations of essential oils, meanwhile, high concentrations would cause severe damages of the structural components of the bacterial cell, such as the homeostasis lost and/or inactivating or destroying the genetic material, causing the cellular death (Jeongmok *et al.*, 1995; Consentino *et al.*, 1999; Bakkali *et al.*, 2008).

In the mechanisms of essential oils as antibacterial agents, must consider the huge number of chemical compounds that are present on the essential oils, which antibacterial activities do not present specific mechanisms. In fact, it is unknown

tes esenciales, mientras que a altas concentraciones provocarían daños severos de los componentes estructurales de la célula bacteriana como es pérdida de homeostasis y/o inactivando o destruyendo el material genético, dando lugar a la muerte celular (Jeongmok *et al.*, 1995; Consentino *et al.*, 1999; Bakkali *et al.*, 2008).

En el mecanismo de acción de los aceites esenciales, como agentes antibacterianos se debe considerar el gran número de compuestos químicos que se encuentran presentes en los aceites esenciales, cuyas actividades antibacterianas no presentan un mecanismo específico. De hecho, se desconoce que componentes o mezclas de ellos son fundamentalmente los responsables de su actividad antimicrobiana (Jeongmok *et al.*, 1995; Bakkali *et al.*, 2008). No obstante, las características lipofílicas están involucradas en la disolución de membranas biológicas, desarrestando estructuras y volviéndose más permeables. Esto puede dar lugar a la salida de iones y otros contenidos celulares (Madigan *et al.*, 2004).

En el cuadro 1 se muestra la actividad antimicrobiana del aceite esencial, frente a los microorganismos gram negativos (*E. coli* ATCC 35218 y *P. aeruginosa* ATCC 27853).

Según los análisis estadísticos realizados las bacterias mantuvieron un mismo comportamiento de inhibición de crecimiento, frente a las concentraciones de aceite esencial utilizados, de esta manera, se observó que el comportamiento de *P. aeruginosa* y *E. coli*, no mostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) al comparar las concentraciones de aceite esencial entre 10 y 50%, lo cual podría indicar que la

which components or mixes of these oils are mainly responsible of the antimicrobial activity (Jeongmok *et al.*, 1995; Bakkali *et al.*, 2008). Nevertheless, the lipophilic characteristics are involved in the dissolution of biologic membranes, disorganizing structures and becoming more permeable. This can cause the exit of ions and other cellular contents (Madigan *et al.*, 2004).

In table 1 is presented the antimicrobial activity of the essential oil against negative gram microorganisms (*E. coli* ATCC 35218 and *P. aeruginosa* ATCC 27853). According to the statistical analysis carried out, the bacteria kept the same growth inhibition behavior towards the concentrations of the essential oil use, likewise, it was observed that the behavior of *P. aeruginosa* and *E. coli*, did not show significant differences ( $P > 0.05$ ) when comparing the concentrations of essential oil from 10 to 50%, which might indicate that the lowest concentration (10%) would have the same inhibitory effect that the highest concentration (50%). Similarly to concentrations from 60 to 100%, where a concentration of 60% will be equally effective than the one of 100%

**Minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oil of orange.** The minimal inhibitory concentration of *E. coli* and *P. aeruginosa* to the different concentrations of the essential oil analyzed were 10% and 9% respectively (table 2). These values determine the lowest concentration of the essential oil, where *E. coli* and *P. aeruginosa* resulted inhibited. Espina *et al.*, (2011) determined the MIC of the essential

**Cuadro 1. Actividad antibacteriana del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) obtenido por el método de hidrodestilación.**

**Table 1. Antibacterial activity of the essential oil of orange (*Citrus sinensis*) obtained by hydrodistillation.**

Microorganismo	Concentraciones empleadas del aceite esencial									
	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
	Halos de inhibición <sup>1</sup> (mm)									
<i>E. coli</i>	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9
<i>P. Aeruginosa</i>	8	8	8	8	9	9	9	10	10	10

<sup>1</sup>Todos los resultados son promedio de 3 mediciones consecutivas.

concentración más baja (10%) tendría el mismo efecto inhibitorio que la concentración más alta (50%). Similarmente ocurre en las concentraciones de 60 a 100%, en la cual una concentración de 60% sería igualmente efectiva que la de 100%.

**Concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite esencial de naranja.** La concentración inhibitoria mínima de *E. coli* y *P. aeruginosa* a las diferentes concentraciones del aceite esencial analizados fueron de 10 y 9%, respectivamente (cuadro 2). Estos valores determinan la menor concentración del aceite esencial en la cual *E. coli* y *P. aeruginosa* resultaron ser inhibidas. Espina *et al.*, (2011) determinaron la CIM de los aceites esenciales de naranja, limón y mandarina, siendo el valor de CIM para *E. coli* y *P. aeruginosa* con un 3 y 4%, respectivamente (30  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), lo cual fue inferior al obtenido en este trabajo con un valor de 10 y 9%, (100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), respectivamente.

González (2010), reportó una concentración inhibitoria mínima de los

oils of orange, lemon and tangerine, being the MIC value for *E. coli* and *P. aeruginosa* of 3% and 4%, respectively (30  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), which was inferior to the one obtained in the current research, with a value of 10 and 9%, (100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), respectively.

González (2010) reported a minimal inhibitory concentration of the extracts of grape seeds (*Vitis vinifera*) for *E. coli* and *P. aeruginosa* of 6%, inferior data to the one obtained in the current research, with a MIC for *E. coli* of 10%, and for *P. aeruginosa* of 9%. Maybe, this difference is due to the fact that the extract of the seeds have more phenolic components, most of these with antibacterial properties (Consentino *et al.*, 1999).

The antibacterial activity obtained in the strains *P. aeruginosa* and *E. coli* is very important, since these are the responsible of serious diseases, with common resistances towards conventional antibiotics. Different essential oils have been evaluated by different researchers. Albado *et al.* (2001) determined the

**Cuadro 2. Concentración inhibitoria mínima del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) Variedad Valencia.**

**Table 2. Minimum inhibitory concentration of the orange essential oil (*Citrus sinensis*), Valencia Variety.**

Microorganismo	Concentración inhibitoria mínima (CIM) (%) <sup>1</sup>
<i>Escherichia coli</i>	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9

<sup>1</sup>Todos los resultados son promedio de 3 mediciones consecutivas.

extractos de semillas de uva (*Vitis vinifera*) para *E. coli* y *P. aeruginosa* de 6%, datos inferiores a los obtenidos en esta investigación resultando una CIM para *E. coli* de 10% y para *P. aeruginosa* de 9%. Probablemente esta diferencia se deba a que el extracto de las semillas contiene más componentes fenólicos los cuales en su mayoría se le atribuyen propiedades antibacterianas (Consentino *et al.*, 1999).

La actividad antibacteriana obtenida ante las cepas *P. aeruginosa* y *E. coli* es relevante debido a que éstas son responsables de infecciones oportunistas graves a menudo presentan resistencia a antibióticos convencionales. Distintos aceites esenciales han sido evaluados por diferentes investigadores. Albado *et al.* (2001), determinaron la actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (Orégano), frente a bacterias gram positivas como *S. aureus* y *B. cereus* y sobre otras bacterias gram negativas, no mostrando la bacteria *P. aeruginosa* sensibilidad frente a este aceite. Luego, Martínez *et al.* (2003) estudiaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina (*Citrus reticula* Blanco)

antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* (Oregano), against positive gram bacteria such as *S. aureus* and *B. cereus* and other negative bacteria; the bacterium *P. aeruginosa* did not shown sensitivity towards this oil. Subsequently, Martínez *et al.* (2003) studied the antibacterial activity of the essential oil of tangerine (*Citrus reticula* Blanco) Var. Dancy. The bacterial strains used for determining the antibacterial activity were: *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. The activity was determined by the diffusion method in agar. The essential oil presented a bactericide activity against *B. subtilis*, *S. aureus* and *L. monocytogenes*. Likewise, Acosta *et al.* (2003) characterized chemically the essential oils of four species of the genre *Ocimum*: *O. basilicum* L. *var basilicum*, *O. basilicum* L. *var purpurenscens*, *O. gratissimum* L., *O. tenuiflorum* L. and the antimicrobial activity against 25 strains of *Staphylococcus aureus* and 18 strains of *Klebsiella pneumonia* multi resistant to nosocomial origin were determined with the diffusion

Variedad Dancy. Las cepas bacterianas que se utilizaron para determinar la actividad antibacteriana fueron: *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. La actividad se determinó por el método de difusión en agar. El aceite esencial presentó actividad del tipo bactericida contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Así mismo, Acosta *et al.* (2003) caracterizaron químicamente los aceites esenciales de cuatro especies del género *Ocimum*: *O. basilicum* L. *varbasilicum*, *O. basilicum* L. *var purpurenscens*, *O. gratissimum* L., *O. tenuiflorum* L. y se les determinó, mediante la técnica de difusión en agar perforado, la actividad antimicrobiana contra 25 cepas de *Staphylococcus aureus* y 18 cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes de origen nosocomial. En este estudio se demostró que en los aceites esenciales de algunas especies de *Ocimum* podrían encontrarse principios activos útiles como alternativas terapéuticas futuras para el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por patógenos multirresistentes.

Posteriormente, Colivet *et al.* (2006) evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos, etéreos y acuosos de ají dulce (*Capsicum chinense*), sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus* sp en agar nutritivo. Los resultados indicaron que el aceite obtenido a partir de ají deshidratado entero a una temperatura de 100°C, mostró mayor poder antimicrobiano. Se ensayaron concentraciones del 100% y diluido a 25%, 50% y 75% siendo la concentración más efectiva para ambos microorganismos 25%.

technique in perforated agar. In this research, it was proved that there might be useful active principles in some essential oils of some *Ocimum* species, such active principles can be used as future therapeutical alternatives for treating nosocomial infections produced by multi-resistant pathogens.

Thereafter, Colivet *et al.* (2006) evaluated the antimicrobial activity of ethanolic, ethereal and aqueous extracts of sweet pepper (*Capsicum chinense*), on the growth of *Escherichia coli* and *Bacillus* sp. in nutritive agar. The results indicated that the oil obtained after the entire dehydrated pepper at a temperature of 100°C showed higher antimicrobial power. Concentrations of 100% were tested and diluted at 25%, 50% and 75%, being the most effective concentration for both microorganisms the one of 25%.

Vides *et al.*, (2010) characterized and determined the antibacterial activity of oil of grape seeds (*Vitis vinífera*), Var. Malvasía; and González (2010) studied the antioxidant and antibacterial activity in extracts of grape seeds (*Vitis vinífera*), Var. Malvasía and Tempranillos, and in both researches, it was proved that the extracts had antibacterial activity to the microorganisms *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*.

The antibacterial activity of essential oils in general depends on different factors, among these are the season of the harvest, the geographic sources, the extraction method, the ripening index of the fruit, the variety, the chemical structure of the

Luego, Vides *et al.* (2010), caracterizó y determinó la actividad antibacteriana del aceite de semillas de uvas (*Vitis vinífera*) Variedad Malvasía y González (2010) estudió la actividad antioxidante y antibacteriana en extractos de semillas de uva (*Vitis vinífera*) Variedad Malvasía y Tempranillos y en ambos estudios se logró demostrar que los extractos presentaban actividad antibacteriana frente a los microorganismos *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.

La actividad antibacteriana de aceites esenciales en general, depende de diversos factores entre los que destacan, las temporadas de cosecha, las fuentes geográficas, el método de extracción, el índice de madurez de la fruta, la variedad, la estructura química de los componentes del aceite y su concentración, el tiempo y las condiciones en que se encuentre almacenado el aceite esencial influyen debido a que este es muy sensible a la luz y a las altas temperaturas por lo que dichos factores pueden intervenir en el poder inhibitorio del aceite (Consentino *et al.*, 1999). En esta investigación se controlaron y se estudiaron estos factores a fin de preservar la composición del aceite esencial de naranja y así su poder antibacteriano.

## Conclusión

El aceite esencial extraído del flavedo de naranja (*Citrus sinensis*) Variedad Valencia, mediante el método de hidrodestilación presentó actividad antibacteriana frente a las bacterias gram negativas (*E. coli* ATCC 35218 y *P. aeruginosa* ATCC 27853),

componentes of the oil and its concentration, the time and the conditions where the essential oil is stored, influence since it is sensitive to the light and high temperatures, thus, such factors might intervene in the inhibitory power of the oil (Consentino *et al.*, 1999). In the current research, these factors were controlled and studied with the aim of preserving the composition of the essential orange oil and its antibacterial power.

## Conclusion

The essential oil extracted from the orange rind (*Citrus sinensis*), Valencia variety, using the hydrodistillation method, presented an antibacterial activity against negative gram bacteria (*E. coli* ATCC 35218 and *P. aeruginosa* ATCC 27853), with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 10 and 9% respectively, thus when inhibiting the bacterial growth that cause rotting, the essential oil of orange (*Citrus sinensis*), Valencia variety, might be considered as a natural preservative to be used in the food industry for the control of human and animal diseases with microbial origin.

## Acknowledgment

The authors thank the Prof. Freddy Leal, who allowed the sample obtaining at the farm "Paso Real", in the Bacterial Antigen Laboratory, Microbiology Laboratory of Post studies at the Science Experimental Faculty, Universidad del Zulia, and the Bacteriologic Reference Center of the Hospital Universitario de Maracaibo,

con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 10 y 9% respectivamente, por lo que al inhibir el crecimiento de bacterias que causan putrefacción, el aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) Variedad Valencia, puede considerarse como un conservante natural a ser utilizado en la industria alimentaria para el control de enfermedades humanas y animales, de origen microbiano.

## Agradecimiento

Los autores agradecen al Prof. Freddy Leal, quien permitió la obtención de muestras en la Finca “Paso Real”, al Laboratorio de Antígenos Bacterianos; Laboratorio de Microbiología de Postgrado de la Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia y al Centro de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo, estado Zulia, por la dotación de las diferentes cepas bacterianas empleadas en la investigación.

## Literatura citada

Acosta, M., M. González, M. Araque, E. Velazco, N. Khouri, L. Rojas y A. Usubillaga. 2003. Composición química de los aceites esenciales de *Ocimumbasilicum L. var basilicum*, *O. Basilicum L. var perpurenscens*, *O. gratissimum L.*, y *O. tenuiflorum L.*, y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. Revista de la Facultad de Farmacia 45 (1): 19–24.

Agusti, M. 2003. Citricultura. España. Editorial Aedos. Segunda Edición. 85–86 pp. Albado, E.; G., Sáez y S., Grabiél. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Oraganum vulgare*

Zulia state, by providing the different bacterial strains used in the current research.

*End of english version*

(Orégano). Universidad Nacional Federico Villarreal. Revista Med Hered. 12 (1): 16–19.

Albado, E., G. Sáez y S. Grabiél. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Oraganum vulgare* (Orégano). Universidad Nacional Federico Villarreal. Revista Medica Herediana. 12 (1): 16–19.

Alzamora, L., L. Morales, L. Armas y G. Fernández. 2001. Medicina tradicional en el Perú: actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Anales de la Facultad de Medicina. 62 (2): 1-157.

Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck y M. Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils – review. Food and Chemical Toxicology 46: 446 - 475.

Burt, S. 2004. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – review. International Journal of Food Microbiology 94: 223–253.

Cavallieri, S., I. Rankin, R. Harbeck, R. Sautter, Y. McCarter, S. Sharp, J. Orte y C. Spiegel. 2005. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. American society for Microbiology. Editorial Marie Coyle 242 p.

CLSI, Documento M100-S21. 2011. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement 31 (1): 22 p.

Consentino, S., C. Tuberoso, B. Pisano, M. Satta, V. Mascia, E. Arzedi y F. Palmas. 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of



- sardinian thymus essential oils. Letters in Applied Microbiology 29: 130–135.
- Colivet, J., G. Belloso y E. Hurtado. 2006. Comparación del efecto inhibitor de extractos de ají dulce (*Capsicum chinense*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus sp.* Revista de la Universidad De Oriente, Núcleo de Monagas 18 (2): 168–173.
- Espina, L., M. Somolinos, S. Lorán, P. Conchello, D. Garcia y R. Pagán. 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. Food Control 22: 896–902.
- Gende, L., S. Fuselli, R. Fritz y M. Eguaras. 2007. Inhibición del crecimiento de *Paenibacillus larvae* SUBSP. *Larvae* frente al aceite esencial de canela (*Cinnamomum Zeylanicum*) y sus componentes. Revista del Departamento de Química. Universidad Nacional Mar de Plata. Argentina. 2 (1): 1–10.
- Gómez, A. 2008. Caracterización de extractos y aceites esenciales. Evaluación de la actividad biológica de hoja de tres especies de *Piperaceae* (*P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. unbellatum*). Revista de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. (3): 26–28.
- González, C. 2010. Estudio de la actividad antioxidante y antibacteriana en extracto de semillas de uva (*Vitis vinifera*) Variedad Malvasia y Tempranillo. Trabajo de Grado de Licenciatura en Química. Universidad Del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias. 42–47 pp.
- Guiza, D. y L. Rincón. 2007. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. 11–35 pp.
- Hammer, K., C. Carson y T. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal Applied Microbiology 86: 985–990.
- Jeongmok, K., R. Maurice y W. Cheng-I. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. Journal Agriculture Food Chemistry 43: 2839–2845.
- LisBalchin, M., S. Deans y E. Eaglesham. 1998. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. Journal Flavour Fragrance 13: 98–104.
- Madigan, M., C. Martinko y J. Parker. 2004. Brock – Biología de los Microorganismos. Madrid-España. Editorial Prentice Hall. Decima Edición 55–81 pp.
- Martínez, J., B. Sulbarán, G. Ojeda de Rodríguez, A. Ferrer y R. Nava. 2003. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ). 20 (4): 502-512.
- Morales de Godoy, V. 1996. Extracción y caracterización del aceite esencial de Lima de *Thaiti Citrus aurantiifolia* (Chritms) swingle. Trabajo Especial de Grado. Universidad Del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Maracaibo, Venezuela. 18–19 pp.
- Moreno, M., D. Belén, M. Sánchez, M. Matos y D. García. 2004. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flavonoides de cascara de naranja en el aceite de soja desodorizado. Revista Interciencia 20 (9): 532–538.
- Rojas, J., A. Perea y E. Stashenko. 2009. Obtención de aceites esenciales y pectinas a partir de subproductos de jugos cítricos. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos –CICTA-. Santander, Colombia. Vitae. 16: (1) 1–10.
- SAS. (2001). User's Guide. Statistics. SAS Institute Inc, Cary, North Carolina.
- Soto, L. 2010. Composición y Actividad Microbiana del Aceite Esencial de Toronja (*Citrus paradisi*). Trabajo de Grado de Magister Scientiarum en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Del Zulia,

Facultad de Ingeniería, Maracaibo, Venezuela. 51 p.

Vides, A. 2010. Caracterización y determinación de la actividad antibacteriana del aceite de semillas de Uvas (*Vitis vinifera*) Variedad Malvasía. Trabajo de Grado de Licenciatura en Química. Universidad Del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Maracaibo, Venezuela. 49 - 57 pp.

Velázquez, M. 2010. Acción antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja, aplicado por adicción directa o por generación de vapores. Trabajo de Grado. Universidad de las Américas Puebla, Escuela de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. 34 - 50 pp.