

**El presente trabajo de investigación se desarrolló en los Laboratorios de Análisis de Aguas Residuales y de Ecodesarrollo, en la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora durante el período Enero-Mayo del año 2004, bajo el asesoramiento del MC. Raúl Holguín Soto.**

## DEDICATORIA

### **A DIOS:**

*Por la vida tan feliz que me has dado, porque me has permitido hacer realidad mis deseos, porque las personas que mas quiero están a mi lado. Por la familia tan hermosa que me has brindado, por enseñarme lo que es el amor y por estar siempre conmigo. ¡Gracias Dios mío!*

### **A MIS PADRES:**

*Jesús Antonio Valenzuela Valdés y Delia Amparo García Escárrega, por permitirme llegar a este mundo, por apoyarme en todo momento, por ser mis guías y conducirme por el camino mas apropiado. Gracias padres por su amor, por su confianza, por ser mis mejores amigos y por su apoyo para la realización de una de mis mas grandes metas. ¡Los amo!*

### **A MIS HERMANOS:**

*Paola e Irvin Antonio, por todas las experiencias compartidas a lo largo de nuestras vidas, por los momentos de felicidad, por su apoyo en los momentos de dificultad, por su confianza, por ser mis mejores amigos y por su amor. ¡Los amo!*

### **A MI NOVIO José Andrés:**

*Gracias mi corazón por todo el amor, comprensión y confianza que me has brindado a lo largo de nuestra carrera , por todo el apoyo para lograr esta meta tan importante para mí, y por ser parte de mi vida. ¡Te amo niño!*

***A MIS ABUELOS:***

*Leonora por el amor y apoyo que me ha brindado en toda mi vida, por estar siempre a mi lado y por sus sabios consejos. A Edrulfo, Antonia y Eduardo que aunque el destino nos ha separado, siguen estando en mi corazón y representan un pilar en mi vida. ¡Los quiero!*

***A MIS SUEGROS:***

*Rosalío Cantú Muñoz e Hilda Barrón de Cantú incluyéndote a ti Carlos, por su apoyo incondicional y por hacerme sentir como un integrante más en su familia. ¡Mil gracias!*

*A toda mi familia, tíos, primos, sobrinos y mi cuñado Alberto, por todo el cariño y confianza demostrada. Agradezco muy especialmente a la familia Parra Baldenegro y a la familia Beltrones Cubedo por abrirme las puertas de su casa y hacerme sentir como un integrante más en la familia, por su gran apoyo incondicional para la realización de una de mis más grandes metas, por su gran confianza y por su cariño. ¡Los quiero!*

*A mis amigos de generación Leydi Diana, Sonia, Illiana, Sirmirng, Andrés (chino), Juan Pablo, Eva, por su apoyo, y estar ahí siempre que los necesito, porque cada uno de ustedes puso una chispa de alegría en mi vida y por demostrarme su más sincera amistad.*

*A mis amigos de toda la vida, Yuriria y Armando por su gran amistad, apoyo y por compartir conmigo mis alegrías y tristezas.*

## AGRADECIMIENTOS

*A mi asesor MC. Raúl Holguín Soto, por su apoyo y amistad que me brindó durante mi carrera y mi formación estudiantil, y mil gracias por los consejos y conocimientos brindados que me ayudaron a culminar esta gran meta. ¡ Muchas gracias Maestro!*

*A mis revisores MC. Blanca Lorenía Reyes Blanco, MC. Rosa Patricia Soto Suárez y MC. Roberto García Rodríguez por el tiempo dedicado, sugerencias y amabilidad para la revisión de este trabajo.*

*A todos mis maestros que me brindaron sus consejos y conocimientos en el transcurso de la carrera hasta llegar a una de las mas importantes metas en mi vida. ¡Por eso mil gracias ;*

# ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE.....	IV
LISTA DE TABLAS.....	VIII
RESÚMEN.....	IX
CAPÍTULO I	
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
1.3 OBJETIVO GENERAL.....	5
1.4 HIPÓTESIS.....	6
1.5 REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	7
1.5.1 Orígenes del limón.....	7
1.5.2 Descripción botánica.....	8
1.5.3 Morfología y Taxonomía.....	9

1.5.4 Propiedades terapéuticas.....	9
1.5.5 Aplicaciones del limón (Citrus Limonium).....	10
1.5.6 Aceites esenciales .....	11
1.5.7 Componentes químicos del aceite esencial.....	12
1.5.8 Procesos químicos para la extracción de aceites esenciales.....	13
1.5.9 Tipos de antibióticos.....	13
1.5.10 Microorganismos patógenos.....	15
1.5.10.1 <i>Escherichia coli</i> .....	16
1.5.10.2 <i>Shigella</i> .....	16
1.5.10.3 <i>Salmonella</i> .....	17

## CAPÍTULO II

### II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 RECOLECCIÓN DE MATERIAL.....	19
2.2 EXTRACCIÓN DE ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN .....	20
2.3 ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL.....	22
2.4 SIEMBRA DE LAS BACTERIAS <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> y <i>Salmonella</i> CON CADA TRATAMIENTO (0.5%, 1%, 2%, 4%).....	23

<b>2.4.1. <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.2. <i>Shigella</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4.3. <i>Salmonella</i>.....</b>	<b>25</b>

## **CAPITULO III**

### **III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

<b>3.1 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRIMERA PRUEBA DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) EN LA CEPA <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRIMERA PRUEBA DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) EN LA CEPA <i>Shigella</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRIMERA PRUEBA DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) EN LA CEPA <i>Salmonella</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SEGUNDA PRUEBA DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) EN LA CEPA <i>E. coli</i>.....</b>	<b>31</b>

<b>3.5 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SEGUNDA PRUEBA DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) EN LA CEPA <i>Shigella</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>3.6 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SEGUNDA PRUEBA DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) EN LA CEPA <i>Salmonella</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>3.7 VISUALIZACIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN COMO BACTERICIDA A DISTINTAS CONCENTRACIONES (0.5%, 1%, 2% Y 4% y Testigo) Y APLICADAS A CADA UNA DE LAS CEPAS (<i>E. coli</i>, <i>Shigella</i> y <i>Salmonella</i>).....</b>	<b>34</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>38</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Clasificación de algunas bacterias .....	18
2	Orden de los tratamientos aplicados para la cepa <i>E. coli</i> .....	24
3	Orden de los tratamientos aplicados para la cepa <i>Shigella</i> .....	25
4	Orden de los tratamientos aplicados para la cepa <i>Salmonella</i> .....	26
5	Resultados del efecto bactericida en la cepa <i>E. coli</i> en la primera prueba .....	28
6	Resultados del efecto bactericida en la cepa <i>Shigella</i> en la primera prueba .....	29
7	Resultados del efecto bactericida en la cepa <i>Salmonella</i> en la primera prueba .....	30
8	Resultados del efecto bactericida en la cepa <i>E. coli</i> en la segunda prueba.....	31
9	Resultados del efecto bactericida en la cepa <i>Shigella</i> en la segunda Prueba.....	32
10	Resultados del efecto bactericida en la cepa <i>Salmonella</i> en la segunda prueba.....	33
11	Resultados generales del efecto bactericida de las semillas de limón a Distintas concentraciones en las cepas <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> y <i>Salmonella</i> .....	35

---

## RESÚMEN

---

Desde el descubrimiento de los primeros agentes antibacterianos, el fenómeno de la resistencia de los microorganismos se ha observado en forma constante y, lamentablemente, en incremento. Sin embargo, el uso de bactericidas a partir de extractos naturales son una alternativa para llevar a cabo la inhibición de la actividad microbiana, y ha producido un importante impacto en la comunidad alimentaria y farmacéutica.

En años recientes se ha incrementado el interés en extractos naturales como alternativa para inactivar microorganismos patógenos. Esto se justifica al

considerar que la mayoría de los desinfectantes químicos dañan el medio ambiente y amenazan la salud pública de la comunidad.

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Análisis de Aguas Residuales y de Ecodesarrollo, en la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora durante el período Enero-Mayo del año 2004.

Para lograr el objetivo de este trabajo, se realizó la extracción del aceite de las semillas de limón por medio del equipo de Soxhlet utilizando como solvente el hexano, realizando posteriormente un proceso de condensación para la recuperación de este compuesto, y así eliminar el posible contenido del solvente en la muestra de aceite ya que podría ser un posible factor que influya en el objetivo del proyecto. El extracto de aceite por sus propiedades fué probado a nivel laboratorio como bactericida en los distintos tipos de cepas tales como *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella*.

El aceite se aplicó impregnado en filtros estériles a cajas Petri con Agar Nutritivo y sembradas con los distintos tipos de bacterias (*E. Coli*, *Shigella* y *Salmonella*), a diferentes diluciones (0.5%, 1%, 2%, 4% y testigos) de manera aséptica e incubándolos posteriormente a una temperatura de 34°C por un período de 24 horas.

Para observar la acción que ejerció el extracto de aceite de la semilla de limón como bactericida se evaluaron las siguientes variables: el nivel de concentración

mas óptimo y el efecto de inhibición en las cepas utilizadas (*E. Coli*, *Shigella* y *Salmonella*).

En los resultados obtenidos mediante las distintas diluciones que se utilizaron en las cajas con medio de Agar Nutritivo y con bacterias (*E. Coli*, *Shigella* y *Salmonella*) se observó que la dilución de aceite de limón mas óptima como agente bactericida fué la concentración de 4 %, ya que inhibió el desarrollo de estas.

---

## I. INTRODUCCIÓN

---

Una de las preocupaciones fundamentales en el hombre es garantizar productos de consumo humano libre de microorganismos, que estén previamente higiénicos y en condiciones no propicias para su presencia y desarrollo.

Pocas personas saben que los alimentos que consumimos cotidianamente pueden causarles daños colaterales conocidas como enfermedades transmitidas por los alimentos. Llamadas así porque el alimento actúa como vínculo en la transmisión de organismos patógenos para el hombre.

Lo anterior nos permite entender la importancia del empleo simultáneo de agentes antibacterianos de origen natural, como es el caso del limón que contiene un alto valor nutricional, al mismo tiempo que principios activos desde el punto de vista bioquímico, que hacen posible también su utilización con propósitos farmacológicos y terapéuticos, fundamentalmente en la medicina tradicional (Fabrocini, 2000).

Desde hace siglos, la medicina popular los utiliza contra un gran número de afecciones como: antisépticos, bactericidas, antipiréticos, antirreumáticos, antigotosos, antiescleróticos, fluidificantes de la sangre, entre otros (Fabrocini, 2000).

El aceite esencial es antiséptico, eupéptico, carminativo y diurético, actividad reforzada por la presencia de flavonoides (citroflavonoides) que, además, ejercen una actividad vitamínica P: venotónica, vasoprotectora (reducen la permeabilidad capilar y aumentan su resistencia). En uso externo es antiséptico, cicatrizante, hidratante y demulcente (Durón, et al., 1999).

Debido al elevado consumo del limón y al conocimiento tradicional de las propiedades terapéuticas, se realizó el presente trabajo como una propuesta para el aprovechamiento de uno de los subproductos de este fruto, el cual consistió en el estudio microbiológico de la acción del extracto de aceite de las semillas de limón en diferentes cepas bacterianas patógenas para el hombre tales como *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*.

---

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

---

La obtención de extractos naturales (aceite) de las semillas de limón para utilizarse como agentes antibacterianos son una alternativa para inactivar y prevenir la presencia de microorganismos patógenos tales como *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella*, lo que justifica su importancia al considerar que la mayoría de los productos antibacterianos de origen químico, pueden presentar daños colaterales y efectos secundarios en el medio ambiente y en la salud pública de la comunidad.

---

## 1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Se plantea la utilización de compuestos naturales a partir de extractos en semillas de limón como una alternativa para cumplir con la función de bactericida, inhibiendo la presencia y el crecimiento de cepas tales como la *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella* en productos de consumo humano, y así posteriormente combatir las consecuencias secundarias que se ocasionan en un largo plazo con el uso de compuestos químicos, el cual provocan daños en la salud de la comunidad.

---

### 1.3 OBJETIVO

---

Evaluar el efecto bactericida del extracto de aceite de las semillas de limón sobre el crecimiento de los distintos tipos de bacterias tales como la *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella*, aplicado en diferentes concentraciones bajo condiciones asépticas en el laboratorio.

---

## 1.4 HIPÓTESIS

---

El extracto de aceite de las semillas de limón actúa como bactericida en los distintos tipos de cepas tales como *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella*, inhibiendo satisfactoriamente la presencia y desarrollo de estas.

---

## 1.5 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

### 1.5.1 Orígenes del limón

El limón (de nombre científico *Citrus limon*) es una de las plantas mas importantes de la familia de las Rutáceas, que se originó hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático. La dispersión de los cítricos desde sus lugares de origen se debió fundamentalmente a los grandes movimientos migratorios: conquistas de Alejandro Magno, expansión del Islam, cruzadas, descubrimiento de América, etc. (Fabrocini, 2000).

Estas fueron introducidas en Europa alrededor del año 1200. Colón fue el responsable de la traída de los cítricos al continente Americano en su segundo viaje en 1493, con semillas de naranjas, limones y citrones. Posteriormente, Bernal Díaz

del Castillo los trajo a México en 1518 a la zona de Veracruz. Fué el misionero jesuita Francisco Eusebio Kino quien introdujo los cítricos a Sonora en 1707 (Durón et al.,1990).

El limón es un fruto de elevado valor nutricional, por lo que tiene un amplio uso en la medicina popular, gracias a la presencia de principios activos desde el punto de vista medicinal. La bioquímica y la farmacognosia práctica y clínica han demostrado ampliamente que el limón, contiene numerosas sustancias esenciales en terapéutica: ácido cítrico, málico y tartárico; citratos de calcio y potasa; glúcidos o azúcares directamente asimilables, como fructosa; sales minerales y oligoelementales; además de las vitaminas, particularmente B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>; C Y PP. Por lo tanto, el limón tiene numerosas propiedades medicinales, por lo que es llamado el fruto de los mil usos (Fabrocini, 2000).

### **1.5.2 Descripción botánica**

El fruto típico de los cítricos se conoce botánicamente como hesperidio, de forma esférica u oblonga, de piel cariácea, de color verde en estado inmaduro, y en la madurez puede ser verde (limas); amarillo (limones, toronjas); naranja (naranjas, mandarinas); rojo(toronjas). La cáscara posee abundantemente glándulas de aceite esencial, el cual difiere en las características entre especies, La parte interior de la cáscara (mesocarpio) es un material esponjoso de color blanco llamado albedo. La parte exterior (exocarpio) contiene las glándulas de aceite y pigmentos conocidos

como flavedo. El interior del fruto (endocarpio) se divide en varios segmentos con paredes membranosas, los cuales están completamente llenos de vesículas de jugo alargadas y en algunas especies también semillas. El jugo contiene azúcares, ácidos orgánicos, principalmente ácido cítrico, pigmentos, glucósidos y sales inorgánicas (Fabrocini, 2000).

### **1.5.3 Morfología y Taxonomía**

Familia: Rutáceas.

Género: Citrus.

Especie: Citrus limón.

Porte: Hábito más abierto (menos redondeado). El extremo del brote se conoce como "sumidad" y es de color morado. Presenta espinas muy cortas y fuertes.

Hojas: Desprenden olor a limón.

Flores: Solitarias o en pequeños racimos.

Fruto: Hesperidio.

### **1.5.4 Propiedades terapéuticas**

El poder terapéutico del limón es muy amplio y ha sido reconocido desde hace mucho tiempo. Por otro lado, el limón es el miembro con más propiedades antisépticas de toda la familia de los cítricos. Es capaz de desinfectar la piel y destruir las bacterias nocivas para la salud. Según pruebas de laboratorio, los

microbios más resistentes mueren rápidamente si se les coloca tan solo una gota de limón, su acción bactericida esta hoy en día ampliamente demostrada, mientras que su capacidad desinfectante se conoce desde siempre (Fabrocini, 2000).

El aceite esencial es antiséptico, eupéptico, carminativo y diurético, actividad reforzada por la presencia de flavonoides (citroflavonoides) que, además, ejercen una actividad vitamínica P: venotónica, vasoprotectora (reducen la permeabilidad capilar y aumentan su resistencia). En uso externo es antiséptico, cicatrizante, hidratante y demulcente (Durón, et al.,1999).

El limón es una planta de complejo vitamínico C, contienen también una gran cantidad de *glucósidos flavónicos*, principios activos de gran interés terapéutico. La esencia del limón esta contenida en la piel del fruto y posee diferentes principios activos: *el limoneno*, sustancia desinfectante (Fabrocini, 2000).

#### **1.5.5 Aplicaciones del limón (Citrus Limonium)**

A partir de la corteza del limón se obtiene la esencia, que es empleada en perfumería. Las flores proporcionan otra esencia aún más apreciada. El zumo es bactericida por excelencia y sirve además para quitar las manchas de tinta y da brillo al bronce y objetos metálicos. El aceite esencial del limón (citrus limonium) es uno de los aceites más ricos en vitaminas, contiene sobretodo vitamina C y caroteno, que es una forma de vitamina A. Contiene también terpenos (limoneno, felandreno, pineno,

sequiterpenos, citrol, citronelol, linalol), acetatos de linalol y geraniol, aldehídos, etc (Wallis, 1966).

Tiene innumerables propiedades, como ser el ingrediente básico en la industria de perfumes y se utiliza además, en jabones, desinfectantes y productos similares. También tiene importancia en la medicina, tanto por su sabor como por su efecto calmante del dolor y su valor fisiológico. En caso de los aditivos, son combinados con los alimentos para producir ciertas modificaciones que impliquen conservación, color, reforzamiento del sabor y estabilización, los cuales van a ayudar a efectuar una mejora sorprendente en nuestros suministros alimenticios (Trease- Evans, 1977).

### **1.5.6 Aceites esenciales**

Los aceites esenciales, son productos químicos que forman las esencias odoríferas de un gran número de vegetales. El término aceite esencial se aplica a las sustancias preparadas a partir de los aceites naturales esenciales. Proceden de las flores, frutos, hojas, raíces, semillas y corteza de los vegetales. Los aceites esenciales de cítricos son "mezclas complejas de compuestos terpenicos que contienen alrededor de 100 componentes" (Wallis, 1966).

Los aceites esenciales son en su mayoría insolubles en agua, pero fácilmente solubles en alcohol, éter y aceites vegetales y minerales. Pueden agruparse en cinco clases, dependiendo de su estructura química: alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas y lactosas.

### **1.5.7 Componentes químicos del aceite esencial**

Limoneno, citral, canfeno, pineno, felandreno, citronelol, terpinol, aldehídoetílico, acetato de linalol, acetato de geraniol, citropteno.

**Los compuestos disueltos en aceites esenciales se pueden clasificar como sigue:**

Esteres: Principalmente de ácido benzoico, acético, salicílico y cinámico.

Alcoholes: Linalol, geraniol, citronelol, terpinol, mentol, borneol.

Aldehídos: Citral, citronelal, benzaldehído, cinamaldehído, aldehído cumínico, vainillina.

Ácidos: Benzoico, cinámico, mirística, isovalérico todos en estado libre.

Fenoles: Eugenol, timol, carvacrol.

Cetonas: Carvona, mentona, pulegona, irona, fenchona, tujona, alcanfor, metilnonil

Esteres: Cíñelo, éter interno (eucaliptol), anetol, safrol.

Lactosas: Cumarina.

Terpenos: Canfeno, pineno, limoneno, felandreno, cedreno.

Hidrocarburos: Cimeno, estireno (feniletileno).

### **1.5.8 Procesos químicos para la extracción de aceites esenciales**

Los aceites esenciales se obtienen por alguno de los métodos siguientes: destilación en corriente de vapor, extracción con disolventes volátiles. Los aceites esenciales en su mayor parte insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, aunque una buena parte del aceite se alcanza a disolver en agua para proporcionar un intenso olor a la solución. Varían desde el color amarillo o café hasta incoloros (Trease-Evans, 1977).

Los aceites esenciales se pueden obtener de las plantas o frutos por varios métodos: por el acto de exprimir, por destilación, por extracción con disolventes volátiles, por enflurage y por maceración (Trease-Evans, 1977).

### **1.5.9 Tipos de antibióticos**

#### **Desinfectante:**

Son sustancias usadas en objetos inanimados (como equipos y material quirúrgico) para destruir los microorganismos y prevenir infecciones. Algunos de estos compuestos se utilizan de forma diluida en tejidos (ya que a la concentración que se utilizan como desinfectantes, destruirían los tejidos).

### **Antiséptico:**

Es un compuesto que es capaz de inhibir o impedir el desarrollo bacteriano o de destruir a microorganismos en tejidos vivos. A diferencia de los desinfectantes que son para objetos inanimados, los antisépticos se aplican en seres vivos.

Como se mencionó anteriormente, algunos compuestos pueden usarse como desinfectantes o antisépticos según la concentración que se utilice (uno de estos compuestos es el Benzalconio de Hidrógeno).

### **Germicida:**

Es una sustancia que destruye microorganismos (pero no esporas). Este tipo de compuestos reciben el nombre axiomático de bactericidas, fungicidas, virucidas, amebicidas, etc, según el tipo de microorganismo sobre el cual actúen. Los Germicidas pueden ser antisépticos o desinfectantes.

Existen ciertas sustancias que influyen negativamente sobre las bacterias, pudiendo ejercer dos tipos de efectos diferentes:

- **Bacteriostáticos:** Sustancia que impiden el crecimiento bacteriano.
- **Bactericidas:** Es la sustancia que destruye toda forma de vida bacteriana.

**Esterilizantes:**

Son compuestos que eliminan tanto las células vegetativas como las esporas cuando son aplicados en diversos materiales durante un tiempo y a una temperatura específica.

**Agentes de saneamiento:**

Son compuestos usados por las organizaciones de salud para la desinfección de excretas y pantanos. Dentro de este grupo están: Fenoles, Álcalis, Hipoclorito y Aldehídos. Por ejemplo el DTT es un agente halogenado que se utiliza para la desinfección de pantanos.

**1.5.10 Microorganismos patógenos****Bacterias**

Según su especie, las bacterias son esféricas, en forma de bastón o de espiral. En algunas especies, las bacterias se organizan en grupos, siendo los mas comunes de ellos pares, racimos cadenas y filamentos. Estos microorganismos patógenos

entéricos pueden proliferar en los alimentos y dar lugar a infecciones alimentarias (Pelczar, 1982).

#### **1.5.10.1 *Escherichia coli***

Este microorganismos son bacilos coliformes, anaerobios facultativos, crecen igualmente bien en condiciones aerobias o de anaerobias completa, y lo hacen profusamente en los medios nutritivos ordinarios, pudiendo cultivarse en soluciones sintéticas conteniendo una sal de amonio y una fuente orgánica, como la glucosa. El crecimiento tiene lugar en límites de temperatura de 10°C a 46°C siendo el más óptimo de 37°C. Las especies de *Escherichia coli* son patógenos a los que puedan infectar tejidos del cuerpo, donde puedan producir infecciones piógenas (Freeman, 1984).

#### **1.5.10.2 *Shigella***

Este género está formado por bacterias Gram negativas, aerobias no esporuladas, no móviles y está constituido por cuatro especies que son: *Sh. dysenteriae*, *Sh. Flexneri*, *Sh. Boydii* y *Sh. Sonnei* (Fernández, 1981).

El género *Shigella* se ve involucrado en enfermedades transmitidas por alimentos, la enfermedad transmitida por el *Shigella* es llamada shigelosis y es de tipo infeccioso. Esta bacteria afecta principalmente a niños, sobre todo a aquellos que viven en

condiciones de higiénicas reprobables, que no cuentan con las facilidades para llevar a cabo las medidas de higiene personal mas elementales (Fernández, 1981).

La enfermedad se caracteriza por la presencia brusca de dolor de cabeza, fiebre, las heces diarreicas están constituidos principalmente por sangre y moco, lesiones inflamatorias del intestino, nauseas y deshidratación (Freeman, 1989).

### **1.5.10.3 *Salmonella***

Estos microorganismos son bacilos gram negativo, no esporulados, perteneciente a la familia de las enterobacterias. Son capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas, siendo la mas óptima a 37°C, pH entre los 4.1-9.0 aunque crece mejor en alimentos poco ácidos, y una actividad de agua (Aw) entre el rango de 0.93-0.95. Actualmente se reconocen 2 especies dentro del género *Salmonella*, *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*. La intoxicación alimentaria por *Salmonella* es consecuencia de la ingestión de alimentos que contienen un elevado numero de microorganismos pertenecientes a cepas apropiadas de *Salmonella*. La gastroenteritis por *Salmonella* es una zoonosis que se transmite por la ingestión de alimentos, agua o fómites contaminados por las heces de un animal o persona infectados y constituye una pandemia de distribución mundial. La enfermedad afecta a todas las edades de la vida, pero con mayor incidencia en lactantes y niños de corta edad (Freeman, 1989).

Los síntomas principales de una infección gastrointestinal por *Salmonella* son náuseas, vómitos, dolor de cabeza y diarrea, que suelen ser de aparición repentina.

Tabla 1. Clasificación de algunas bacterias

GRAMPOSITIVOS	GRAMNEGATIVOS
<b>COCOS</b>	<b>COCOS</b>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Neisseria</i>
<i>Aureus o epidermidis</i>	<i>Gonorrhoeae</i>
Estreptococos beta (grupos A, B, G)	<i>Neisseria</i>
<i>Estreptococcus</i>	<i>Meningitidis</i>
<i>Viridans</i>	<i>Branhamella</i>
<i>Estreptococcus bovis</i>	<i>Catarrhalis</i>
Enterococos	
Pneumococos	
<b>BACILOS</b>	<b>BACILOS</b>
<i>Bacillus anthracis jejuni</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Bordetella pertusis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Brucella sp.</i>
	<i>Campylobacter</i>
	<i>Enterobacter sp.</i>
	<b><i>Escherichia coli</i></b>
	<i>Francisella tularensis</i>
	<i>Haemophilus influenzae</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Legionella pneumophila</i>
	<i>Pasteurella multocida</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Proteus, indol positivos</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

	<i>Salmonella sp.</i>
	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Shigella sp.</i>
	<i>Yersinia pestis</i>

---

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

---

El experimento se llevó a cabo en los Laboratorios de Aguas Residuales y Ecodesarrollo de la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), durante el periodo Enero-Mayo del 2004.

### 2.1 RECOLECCIÓN DE SEMILLAS

La obtención de la materia prima utilizada (semillas de limón), se recolectó a partir de los limones consumidos en el Restaurant “Los Arbolitos”. Con un total de muestra de 61.094gr.

## **2.2 EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN**

Para llevar a cabo la extracción del aceite de las semillas de limón, se realizó primeramente un secado de las semillas en el horno de Equatherm a una temperatura de 60° C por un tiempo de 3 días, esto fué para eliminar la humedad y los posibles residuos del fruto del limón adheridos a las semillas, y así evitar una mala molienda y que queden residuos en el molino al momento de llevar a cabo el proceso de trituración.

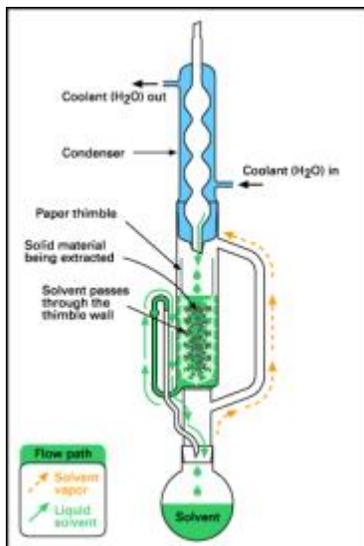
El secado es una operación de transferencia de masa de contacto gas-sólido, donde la humedad contenida en el sólido se transfiere por evaporación hacia la fase gaseosa, en base a la diferencia entre la presión de vapor ejercida por el sólido húmedo y la presión parcial de vapor de la corriente gaseosa (Tejeda, 1995).

Posteriormente se realizó la trituración de las semillas de limón por medio de un molino eléctrico, para que los componentes del aceite de las semillas sean mas fácil de extraer.

La extracción del aceite de las semillas se realizó por medio del equipo de Soxhlet, el cual funciona cíclicamente, para extraer las concentraciones necesarias de algún

determinado compuesto. Este funciona, cuando se evapora el solvente sube su gas, hasta el área donde es condensado, aquí al caer y regresar a la cámara de solvente va separando los compuestos, hasta que se llega a una concentración deseada.

**Figura 1. Equipo de Soxhlet**



Las semillas bien molidas se introducen al equipo de Soxhlet, utilizando como solvente el hexano, este proceso de extracción se llevo a cabo por un tiempo de 6 horas, hasta extraer totalmente el aceite contenido en las semillas de limón .

Después de haber terminado el tiempo de extracción, se realizó el proceso de recuperación del hexano realizando un reflujo del hexano y separándolo posteriormente, para eliminar el posible contenido de este solvente en la muestra de aceite. Se dejó reposar la muestra de aceite por un tiempo de 6 horas en el horno de Equatherm a una temperatura de 60°C , hasta evaporarse todo el hexano y evitar que queden residuos, ya que podría ser un posible factor que influya en el objetivo

del proyecto y así no obtener resultados confiables al momento de realizar el experimento.

Para obtener las dosis requeridas de aceite para este experimento, se realizó lo siguiente:

Se prepararon a partir del concentrado del aceite, las diluciones de: 0.5%, 1%, 2% y 4%, en matraces aforados de 100 ml con agua estéril.

### **2.3 ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL**

Se llevó a cabo la esterilización del material a utilizar en la autoclave como se muestra a continuación, a una temperatura de 121°C y a una presión de 15Lb/pulg<sup>2</sup>:

Cajas Petri

Medio Agar Nutritivo

Agua destilada

6 Matraces aforados de 100ml.

Pipetas

Filtros

Pinzas

El estudio del efecto del extracto de aceite de las semillas de limón a distintas concentraciones (0.5%,1%, 2%, 4% y Testigo) en las cepas bacterianas E. coli,

Shigella y Salmonella , se realizó en 2 pruebas para cada una de estas, de manera aséptica.

#### **2.4 SIEMBRA DE LAS BACTERIAS *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella*, CON CADA TRATAMIENTO (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo).**

Las cepas de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* fueron proporcionadas por el Ing. Jorge Robles del Laboratorio de Microbiología de Veterinaria del Instituto Tecnológico de Sonora, en el mes de Febrero del año 2004.

##### **Testigo**

Esta cepa no recibió aplicación alguna de las distintas concentraciones del extracto de las semillas de limón (Bactericida). Los testigos se realizaron con cada una de las cepas bacterianas (*E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*) llevando a cabo dos pruebas, tomando los filtros previamente estériles impregnados con agua estéril.

##### **2.4.1 *Escherichia coli***

Se llevó a cabo la siembra de la bacteria *E. coli* en cajas Petri estériles con medio Agar Nutritivo de manera aséptica. Posteriormente, se impregnaron 3 filtros estériles por caja con cada una de las diferentes diluciones (0.5%, 1%, 2% Y 4%) y se introdujeron en ellas, llevando un orden de menor a mayor concentración de la

dilución del extracto, como se puede observar en la Tabla 2. También se preparó un testigo. Se incubaron a una temperatura de 36°C por un periodo de 24 hrs.

**Tabla 2. Tratamientos aplicados para la cepa *Escherichia coli*.**

No. DE CAJAS	PRIMERA PRUEBA	SEGUNDA PRUEBA
1	0.5%	0.5%
2	1%	1%
3	2%	2%
4	4%	4%
Testigo	0%	0%

#### **2.4.2 *Shigella***

Se realizó la siembra para la cepa *Shigella* en cajas Petri estériles con medio Agar Nutritivo de manera aséptica. En la Tabla 3, se observa los tratamientos aplicados, llevando un orden de menor a mayor concentración, los cuales consistió en impregnar 3 filtros estériles por caja con cada de una de las diferentes diluciones (0.5%, 1%, 2% Y 4%) y se introdujeron en cada una de ellas; también se preparó un testigo. Se incubaron a una temperatura de 36°C por un periodo de 24 hrs.

**Tabla 3. Tratamientos aplicados para la cepa *Shigella*.**

No. DE CAJAS	PRIMERA PRUEBA	SEGUNDA PRUEBA
1	0.5%	0.5%
2	1%	1%
3	2%	2%
4	4%	4%
Testigo	0%	0%

#### **2.4.3 *Salmonella***

Al igual que las anteriores se realizó la siembra para la cepa *Salmonella*, en cajas Petri estériles con medio Agar Nutritivo de manera aséptica. En la Tabla 4, se observa los tratamientos aplicados, llevando un orden de menor a mayor concentración, los cuales consistió en impregnar 3 filtros estériles por caja con las diferentes diluciones de tratamiento (0.5%, 1%, 2% Y 4%) y se introdujeron en cada una de ellas; también se preparó un testigo. Se incubaron a una temperatura de 36°C por un periodo de 24 hrs.

**Tabla 4. Tratamientos aplicados para la cepa *Salmonella*.**

No. DE CAJAS	PRIMERA PRUEBA	SEGUNDA PRUEBA
1	0.5%	0.5%
2	1%	1%
3	2%	2%
4	4%	4%
Testigo	0%	0%

La extracción del aceite de las semillas de limón se realizó en el Laboratorio de Aguas Residuales a través del equipo de Soxhlet, y la siembra de las distintas cepas bacterianas (*Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella*) en el Laboratorio de Ecodesarrollo, en la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), durante el período Enero-Mayo del año 2004.

---

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

A continuación se muestran los resultados de la primera prueba, obtenidos de las variables evaluadas en cada una de las cepas *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* con las concentraciones aplicadas (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo), los cuales se presentan de manera independiente:

#### **3.1 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRIMERA PRUEBA DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) EN LA CEPA *Escherichia coli*.**

Los resultados obtenidos en la determinación del efecto del extracto de aceite de las semillas de limón como bactericida en la cepa *E. coli*, utilizando diluciones a distintas concentraciones (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo), se muestran en la Tabla 5, y se observó que en las concentraciones de 0.5% y el testigo no hubo inhibición de crecimiento, por lo que implica que no hubo buen efecto del bactericida a esas concentraciones en la cepa, mientras que las diluciones a las concentraciones de 1%, 2% y 4% si hubo inhibición del crecimiento de esta bacteria.

**Tabla 5. Resultados del efecto bactericida en la cepa *E. coli* en la primera prueba.**

Dilución	Crecimiento	No Crecimiento
0.5%	+	-
1%	-	+
2%	-	+
4%	-	+
Testigo	+	-

**3.2 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRIMERA PRUEBA DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) EN LA CEPA *Shigella*.**

Los resultados obtenidos en la determinación del efecto del extracto de aceite de las semillas de limón como bactericida en la cepa *Shigella*, utilizando diluciones a distintas concentraciones (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo), se muestran en la Tabla 6, y se observó que en las concentraciones de 0.5%, 1%, 2% y testigo no hubo inhibición de crecimiento por lo que implica que no hubo efecto del bactericida a esas concentraciones en la cepa, mientras que en la concentración de 4% si hubo inhibición del crecimiento de esta bacteria.

**Tabla 6. Resultados del efecto bactericida en la cepa *Shigella* en la primera prueba**

Dilución	Crecimiento	No Crecimiento
0.5%	+	-
1%	+	-
2%	+	-
4%	-	+
Testigo	+	-

**3.3 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRIMERA PRUEBA DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) EN LA CEPA *Salmonella*.**

Los resultados obtenidos en la determinación del efecto del extracto de aceite de las semillas de limón como bactericida en la cepa *Salmonella*, utilizando diluciones a distintas concentraciones (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo), se muestran en la Tabla 7, y se observó que en las concentraciones de 0.5% y testigo no hubo inhibición de crecimiento por lo que implica que no hubo un buen efecto del bactericida a esas concentraciones en la cepa, mientras que en las concentraciones de 1%, 2% y 4% si hubo inhibición del crecimiento de esta bacteria.

**Tabla 7. Resultados del efecto bactericida en la cepa *Salmonella* en la primera prueba**

Dilución	Crecimiento	No Crecimiento
0.50%	+	-
1%	-	+
2%	-	+
4%	-	+
Testigo	+	-

A continuación se muestran los resultados de la segunda prueba, obtenidos de las variables evaluadas en cada una de las cepas *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* con las diluciones correspondientes (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo), los cuales se presentan de manera independiente:

### 3.4 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SEGUNDA PRUEBA DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) EN LA CEPA *E. coli*.

Los resultados obtenidos en la determinación del efecto del extracto de aceite de las semillas de limón como bactericida en la cepa *E. coli*, utilizando distintas concentraciones (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) se muestran en la Tabla 8 y se observó que en las concentraciones de 0.5%, 1%, 2% y testigo, presentó inhibición de crecimiento por lo que implica que no hubo un buen efecto del bactericida a esas concentraciones en la cepa, mientras que en las concentraciones de 4% si hubo inhibición del crecimiento de esta bacteria.

**Tabla 8. Resultados del efecto bactericida en la cepa *E. coli* en la segunda prueba.**

Dilución	Crecimiento	No Crecimiento
0.50%	+	-
1%	+	-
2%	+	-
4%	-	+
Testigo	+	-

### 3.5 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SEGUNDA PRUEBA DEL EFECTO DEL EXTRACTO DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) EN LA CEPA *Shigella*.

En la Tabla 9 se presentan los resultados obtenidos en la determinación del efecto del extracto de aceite de las semillas de limón como bactericida en la cepa *Shigella*, utilizando distintas concentraciones (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) y muestran una diferencia en el crecimiento para cada una de ellas. En las concentraciones de 0.5% y testigo no hubo inhibición de crecimiento por lo que implica que no hubo un buen efecto del bactericida a esas concentraciones en la cepa, mientras que en las concentraciones de 1%, 2% y 4% si hubo inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas.

**Tabla 9. Resultados del efecto bactericida en la cepa *Shigella* en la segunda prueba.**

Dilución	Crecimiento	No Crecimiento
0.5%	+	-
1%	-	+
2%	-	+
4%	-	+
Testigo	+	-

### 3.6 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SEGUNDA PRUEBA DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) EN LA CEPA *Salmonella*.

Los resultados obtenidos en la determinación del efecto del extracto de aceite de las semillas de limón como bactericida en la cepa *Salmonella*, utilizando diluciones a distintas concentraciones (0.5%, 1%, 2%, 4% y Testigo) se presentan en la Tabla 10 y se muestra que hubo una diferencia en el crecimiento para cada una de ellas. En las concentraciones de 1% y testigo no hubo inhibición de crecimiento por lo que implica que no hubo un buen efecto del bactericida a esas concentraciones en la cepa, mientras que en las concentraciones de 0.5%, 2%, 4% si hubo inhibición del crecimiento de esta bacteria.

Tabla 10. Resultados del efecto bactericida en la cepa *Salmonella* en la segunda prueba.

Dilución	Crecimiento	No Crecimiento
0.5%	-	+
1%	+	-
2%	-	+
4%	-	+
Testigo	+	-

### **3.7 VISUALIZACIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LIMÓN COMO BACTERICIDA A DISTINTAS CONCENTRACIONES (0.5%, 1%, 2% Y 4% y Testigo) Y APLICADAS A CADA UNA DE LAS CEPAS (*E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*)**

El extracto de aceite de las semillas de limón mostró una acción bactericida gratificante, ya realizadas las pruebas en las diferentes cepas bacterianas (*E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*) a distintas concentraciones (0.5%, 1%, 2% y 4%), y se observó que la dilución a la concentración de 4% es la mas óptima como bactericida, ya que ejerció una mayor acción inhibitoria sobre el crecimiento de las cepas utilizadas, tanto en *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella*, tal como lo muestra la Tabla 11 .

Se observó que hubo una mejor acción bactericida del extracto de aceite de las semillas de limón en la cepa de *Salmonella* a diferencia con los resultados obtenidos de las bacterias *E. coli* y *Shigella*, ya que presentó una mayor inhibición del crecimiento en las diferentes pruebas y en los distintas concentraciones realizadas.

Por lo que se logró confirmar con los resultados obtenidos y de acuerdo con la revisión bibliográfica, que las semillas de limón contiene propiedades tales como el *limoneno* y entre otras, que inhiben la presencia y desarrollo de cepas bacterianas patógenas en el hombre, específicamente la cepa *Salmonella*.

Por lo tanto se demostró que este extracto de aceite de las semillas de limón, es una alternativa en el uso como bactericida para inhibir la presencia y desarrollo de cepas bacterianas tales como *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* en productos de consumo humano, por lo que puede sustituir a productos químicos que cumplen con la misma función, ya que el uso de este tipo de productos a largo plazo pueden presentar consecuencias secundarias, que provocan daños en la salud de la comunidad.

**Tabla 11. Resultados generales del efecto bactericida de las semillas de limón a distintas concentraciones en las cepas *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*.**

Concentración	<i>E. coli</i>		<i>Shigella</i>		<i>Salmonella</i>	
	Crecimiento	No Crecimiento	Crecimiento	No Crecimiento	Crecimiento	No Crecimiento
0.5%	+	-	+	-	+	-
0.5%	+	-	+	-	-	+
1%	-	+	+	-	+	-
1%	+	-	-	+	+	-
2%	-	+	+	-	-	+
2%	+	-	-	+	-	+
4%	-	+	-	+	-	+
4%	-	+	-	+	-	+
Testigo	+	-	+	-	+	-
Testigo	+	-	+	-	+	-

---

## CONCLUSIONES

---

Los resultados obtenidos del efecto bactericida del extracto de aceite de las semillas de limón fueron satisfactorios, ya que en la dilución a una concentración de 4%, fué la mas óptima para inhibir la presencia y crecimiento de las bacterias *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella*, por lo que se demuestra la acción bactericida que este contiene a esta concentración, comparándola con las diluciones de 0.5%, 1% y 2%, el cual estas presentaron un desequilibrio en la inhibición del crecimiento bacteriano.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, se observó que el extracto de aceite de las semillas de limón ejerció una mayor acción de inhibición sobre la bacteria *Salmonella* en comparación con las cepas *E. coli* y *Shigella*.

Por lo tanto, el extracto de aceite basado de compuestos orgánicos naturales (semillas de limón) es una alternativa como bactericida y un sustituto de los productos químicos utilizados hoy en día, combatiendo la presencia de microorganismos que son patógenos para el hombre, utilizándose ampliamente en la industria de los alimentos.

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

DE LA GARZA, S. C.,(2000). Evaluación del efecto del ácido salicílico en Limón Verdadero (Citrus medica L.) y Cidra (Citrus medica L.) bajo condiciones de hidroponía, Tesis Licenciatura. ITSON. Cd. Obregón, Sonora.

DURON, N. L. J., G. Martínez y J. H. Nuez, (1999). El cultivo de los cítricos. Editorial SARH-INIFAP-CIRNO-CECH.

FABROCINI Chiara y Vincenzo, (2000). Cómo curarse con los Cítricos, Editorial DE VECCHI; Barcelona. pp. 6-10.

FERNANDEZ, E. Eduardo (1981). Microbiología. 2ª Edición, Editorial Interamericana S. A., México.

FREEMAN, Bob. (1984). Microbiología de Burrows, 21ª Edición, Nueva Editorial Interamericana, México, D.F. pp. 506-509, 623-626.

GARCÍA, G. G.,(1992) Evaluación de cinco funguicidas para el control del complejo de enfermedades foliares e incremento de la producción del soya (Glycine max (L) Merrill), en el valle del yaqui, Son., Tesis Licenciatura. ITSON. Cd. Obregón, Sonora.

JOHN; Bryant. Mejoramiento mundial de salud pública, Editorial Pax-México. México D.F.

MADIGAN, Michael, Martingo John, Parker Jack.,(1984) Brock. Biología de los microorganismos, Editorial Pearson Educación, New Jersey.

PELCZAR, M., Ried, R.,Chan, E. C. S. (1982). Microbiología. Editorial Mac Graw-Hill.

TEJEDA Armando, Montesinos R., Guzmán R. (1995), Bioseparaciones. Editorial Unison, México, D. F.

TREASE-EVANS; (1977); Farmacognosia. Edit. Compañía Editorial Continental C.E.C.S.A. México D.F. pp. 550-554.

WALLIS T.E.; (1966); Manual de Farmacognosia; Compañía Editorial Continental; México D.F. pp. 312-315.

<http://www.infoagro.com/citricos/limon.htm>

<http://www.botanical-online.com/medicinalslimon.htm>

<http://www.geocities.com/frentetambogrande/noticias/2001/004.html>

<http://waste.ideal.es/limonero.htm>