

Actividades complementarias

Aprende sobre la ciencia de los cítricos con el limoneno

Actividad complementaria 1: Actividad antibacteriana

Muchos aceites esenciales muestran actividad antimicrobiana.^[1] En este experimento, los alumnos investigarán las propiedades antibacterianas del limoneno. La actividad dura alrededor de 45 min de preparación y los resultados se obtienen después de 7-14 días.



Crecimiento bacteriano en cajas Petri

Imagen por cortesía de los autores

Materiales

- 24 almohadillas de algodón
- discos de papel pequeños
- 7 cajas de Petri con tapa
- 1 naranja orgánica sin cera
- blanqueador
- etanol al 96%
- medios de cultivo: por ejemplo: 300 ml de agua, 10 g de extracto de caldo de res, 10 g de azúcar blanca, 4 g de agar.
- Cultivos de *Escherichia coli* o muestras tomadas de superficies en el aula

Procedimiento



1. El profesor(a) o técnico(a) deben preparar cajas de Petri con agar antes de la clase. Los alumnos realizarán los siguientes pasos.
2. Con unos guantes, frota una bola de algodón o un hisopo húmedo (que no gotee) sobre la piel de una naranja.
3. En un tubo de ensayo con una pequeña cantidad de agua destilada (1-2 ml), moja la bola de algodón o el hisopo.
4. Diluye la muestra (10×); pon 1 ml de agua extraída del algodón y agrega 9 ml de agua.
5. Extrae 1 ml de la muestra diluida, moja una bola de algodón o hisopo nuevo con ella y pásala sobre toda la superficie de seis de las siete cajas de Petri.
6. Introduce la *E. coli* o las bacterias de las muestras tomadas en el aula en la séptima caja de Petri. En esta misma caja, coloca un círculo de papel con 0.1 ml de limoneno sin diluir sobre él.
7. Pon 0.1 ml de limoneno en un círculo de papel y colócalo en una de las seis cajas de Petri restantes (donde se introdujo la bacteria de la piel de la naranja).
8. Prepara una dilución al 25% de limoneno en alcohol.
9. Pon 0.1 ml de la muestra de limoneno sobre un círculo de papel. Prueba también con la cáscara de naranja: primero exprime la piel sobre el papel y luego colócalo en la caja de Petri.
10. Prepara los controles con alcohol (el control solvente), nada en el papel (control negativo) y blanqueador (control positivo).
11. Tapa las cajas de Petri, sállalas con cinta adhesiva y escribe tu nombre y los químicos que agregaste. Guarda los platos boca abajo y a temperatura ambiente.
12. Después de 7-14 días, toma fotos a las cajas de Petri y anota los resultados.
13. Cuando hayas terminado el experimento, agrega blanqueador para esterilizar las cajas de Petri.

Discusión

Siembra de bacterias	Químico agregado	Crecimiento bacteriano
Bacteria de la superficie de la piel de naranja	Blanqueador (Control +)	-
	Nada (Control -)	+
	Alcohol (Control para las soluciones)	+
	Limoneno al 100%	+
	Limoneno al 25% diluido en alcohol	+
	Extracto de piel de naranja	+
<i>E. coli</i> o las bacterias que se tomaron del aula	Limoneno al 100%	-



www.scienceinschool.org

Los controles negativos y positivos del blanqueador, nada y etanol, producen los resultados esperados; por lo tanto, el experimento se realizó correctamente. Ni el limoneno ni el aceite de la piel de naranja inhiben el crecimiento de microorganismos sobre la superficie de la naranja.

Los estudios han demostrado que el limoneno puede inhibir el crecimiento de varios tipos de bacterias,^[2-4] pero no inhibe el crecimiento de las bacterias de la piel de naranja. Esto se puede explicar gracias a un proceso evolutivo de adaptación de algunos tipos de bacterias comunes en el área del Mediterráneo, donde crecen plantas que producen limoneno.

Del mismo modo, donde crecen frutos cítricos, lo natural es que la fruta madura y las hojas caigan al suelo, donde dispersan limoneno; por lo tanto, incluso de esta forma, algunas familias de bacterias se adaptan para degradar esta sustancia.



Actividad complementaria 2: Actividad anti germinadora

Los aceites esenciales pueden inhibir la germinación de semillas. En esta actividad, los alumnos podrán investigar la capacidad antigerminadora del limo-neno. La actividad dura alrededor de 30 min.

Materiales

- 30 semillas de lentejas secas o alguna otra semilla que germine rápido.
- agua
- 96 % de etanol
- (S)-limoneno
- piel de naranja
- lana de algodón
- 6 cajas de Petri de 7-9 cm de diámetro con tapa
- 10 pipetas de plástico

Procedimiento

1. Humedece un pedazo de algodón; no debe gotear el agua.
2. Coloca el algodón en una caja de Petri.
3. Coloca 5 semillas encima del algodón húmedo.
4. Cubre y cierra una de las tres cajas de Petri
5. Pon un pedazo de piel de naranja en la segunda caja de Petri y ciérrala.
6. Coloca una bola de algodón pequeña en cada una de las otras tres cajas de Petri.
7. Pon una gota de (S)-limoneno puro en la bola de algodón pequeña de la tercera caja de Petri (limoneno concentrado al 100%).
8. Diluye 1 ml de limoneno con 1 ml de alcohol (limoneno concentrado al 50%).
9. Pon una gota de limoneno (concentrado al 50%) en la bola de algodón pequeña en la cuarta caja de Petri.
10. Diluye 1 ml de limoneno con 3 ml de alcohol (limoneno concentrado al 25%).
11. Pon una gota de limoneno (concentrado al 25%) en la bola de algodón pequeña en la quinta caja de Petri.
12. Diluye 1 ml de limoneno con 9 ml de alcohol (limoneno concentrado al 10%).
13. Pon una gota de limoneno (concentrado al 10%) en la bola de algodón pequeña en la sexta caja de Petri.
14. Tapa todas las cajas de Petri, séllalas con cinta adhesiva para evitar que se abran y guárdalas a temperatura ambiente. Se pueden guardar en ambientes tanto iluminados como oscuros; pero debe ser el mismo ambiente para todas las muestras.
15. Los resultados se observan después de 3-5 días.

Discusión



Inhibición de la germinación de semillas por limoneno

Imagen por cortesía de los autores

	Número de lentejas que germinaron	% de lentejas que germinaron
Nada (Control +)	5/5	100
Limoneno al 100%	0/5	0
Limoneno al 50%	0/5	0
Limoneno al 25%	0/5	0
Limoneno al 10%	0/5	0
Piel de naranja	5/5	100

- El limoneno inhibe la germinación de las lentejas; funciona con todas las concentraciones que se usaron: 100%, 50%, 25% y 10%.



www.scienceinschool.org

- La piel de naranja no inhibe la germinación. Esto puede deberse a que la concentración del limoneno es menor que la de los otros experimentos.

Se reportó actividad antigermadora por limoneno y otros aceites esenciales. Podría ser un mecanismo de las plantas productoras para limitar la competencia con otras especies de plantas cercanas.^[5,6]

References

- [1] Tongnuanchan P, Benjakul S (2014) [Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation](#). *Journal of Food Science* **79**: R1231–R1249. doi: 10.1111/1750-3841.12492
- [2] Espina L et al. (2013) [Mechanism of Bacterial Inactivation by \(+\)-Limonene and Its Potential Use in Food Preservation Combined Processes](#). *PLOS One* **2**: e56769. doi: 10.1371/journal.pone.0056769
- [3] Aggarwal KK et al. (2002) [Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*](#). *Flavour and Fragrance Journal* **17**: 59–63. doi:10.1002/ffj.1040
- [4] Celaya LS et al. (2014) [The inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by essential oils isolated from leaves and fruits of *Schinus areira* depending on their chemical compositions](#). *Acta Biochimica Polonica* **61**: 41–46. doi:10.18388/abp.2014_1921
- [5] Abraham D et al. (2000) [Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize](#). *Journal of Chemical Ecology* **26**: 611–624. doi: 10.1023/A:1005467903297
- [6] Azirak S, Karaman S (2007) [Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species](#). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science* **58**: 88–92. doi: 10.1080/09064710701228353