

“METODO DE OBTENCION DE UN ANTIBACTERIANO NATURAL CONTRA ESCHERICHIA COLI EXTRAÍDO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES”

Ultimo título sugerido:

“METODO DE OBTENCION DE UN ANTIBACTERIANO NATURAL EXTRAÍDO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES ACTIVO CONTRA ESCHERICHIA COLI”

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a la obtención de un antimicrobiano natural extraído de un residuo agroindustrial denominado cutícula de *Aloe vera*, mediante extracción con una mezcla de solventes en proporciones específicas y ultrasonido. El compuesto antimicrobiano tiene actividad antimicrobiana específica contra la bacteria patógena *Escherichia coli* (*E. coli*), por lo tanto, puede tener múltiples formas de uso: para humanos y animales, para frutas y hortalizas enteras para prevenir contaminaciones bacterianas por manipulación de alimentos, y como ingrediente en el diseño de empaques naturales con protección antimicrobiana.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los antibacterianos modernos son compuestos con un alto grado de especificidad hacia su organismo objetivo. Sin embargo, hay crecientes preocupaciones sobre peligros para la salud y para el ambiente (*Grupta & Dikshit, 2010*). El uso continuo de estos compuestos ha conducido en muchos casos a la proliferación de biotipos resistentes de microorganismos patógenos.

En términos generales el uso inadecuado de antibióticos en la medicina humana y veterinaria para el control de enfermedades infecciosas ha promovido el desarrollo del fenómeno de resistencia bacteriana (*Ouwehand et al., 2016*), haciendo que las bacterias utilicen estrategias para aumentar su capacidad de adaptación y supervivencia en condiciones adversas, generando a su vez genes

de resistencia, nuevos mecanismos de patogenicidad y aumento en la virulencia de los microorganismos (Cárdenas et al., 2014).

La resistencia a los antimicrobianos tanto en humanos como en animales de consumo es una amenaza a la salud pública a nivel mundial, y la presencia de residuos de antibióticos en los tejidos de los animales de consumo son consecuencias adicionales del uso inadecuado de los antibióticos (Mathipa & Thantsha, 2017), por lo tanto, se deben tomar medidas para evitar este fenómeno (WHO, 2014).

En animales se ha evidenciado que la resistencia de *E. coli* al tratamiento se encuentra más frecuentemente asociada con las granjas que hacen un mayor uso de antibióticos (Amezcueta et al., 2002), y se ha reportado un incremento de cepas de *E. coli* multi resistentes a antibióticos (Luppi, 2017).

En relación a la cutícula de hojas de *Aloe vera*, este residuo representa más de la mitad del peso de la hoja (Kwon et al., 2011), lo cual tiene efecto considerable sobre la eficiencia económica de la industria del proceso de extracción del *Aloe vera*. Se infiere que, si toda la producción anual de *Aloe vera* colombiana se utilizara para producir gel, se generarían como mínimo 3.000 toneladas de residuos anuales, lo cual tiene efecto considerable sobre el medio ambiente. Por lo tanto, la búsqueda de valor agregado a este residuo es prioritaria.

Como se puede apreciar, existe la necesidad de tener disponibles antimicrobianos naturales (para el suministro a humanos y a animales), que logren mitigar el problema de resistencia bacteriana ocasionada por el uso indiscriminado de antibióticos, y además la necesidad de dar valor agregado a los residuos que se generan en la agroindustria de *Aloe vera*.

Las siguientes invenciones hacen mención de la aplicación de *Aloe vera* para distintas preparaciones, no obstante, ninguno de estos documentos describe la obtención de cutícula de *Aloe vera*, y los problemas que resuelven dichas invenciones en algunos casos similares a los que resuelve la presente invención, tienen grandes diferencias técnicas.

El documento de solicitud de patente **KR20100088296** y titulado “**THE ANTI-BACTERIAL COSMETIC COMPOSITION**” proporciona una composición cosmética antibacteriana para garantizar una actividad antibacteriana de amplio espectro. La composición cosmética antibacteriana consta de: 0,05 – 0,5% en peso de extracto de *Aloe vera*, 1-5% en peso de extracto de aceite de nuez *Areca Catechu*, 0,1- 1,0% en peso de un nano compuesto de plata basado en la composición total. El extracto de Aloe se obtiene extrayendo una mezcla de extracto de las hojas de *Aloe arborescens*, y Aloe vera secado con cáscara con éter. El nano compuesto de plata se produce mediante un método físico como una explosión eléctrica de plasma. Este documento difiere de la invención de la presente solicitud en que la obtención del antimicrobiano natural a partir de un residuo agroindustrial de cutícula de Aloe vera, se realiza mediante extracción con una mezcla de solventes en proporciones específicas y ultrasonido, utilizando el extracto de cutícula de Aloe vera, de modo que se trata de procedimientos y técnicas distintas.

Igualmente, el documento referenciado como **CN107510768** y denominado como “**HERBAL BACTERIOSTATIC GEL**” describe un gel bacteriostático de hierbas. El gel se compone principalmente de los siguientes componentes en porcentaje en peso: 1.0-3.5% de troclat, 1.5-4.0% de sophora, 0.5-3.5% de Filia teng, 0.3-2.8% de un extracto de menta, 0.4-3.0% de un extracto de agripalma, 40-65% de Aloe golvera, 0.3-2.0% de semen cnecos, 0.5-3.0% de radix Angelicae sinensis, 0.1-3.0% de un extracto de Fructus Ionicerae, 0.3-2.3% de un extracto de cnidium, 0.1- 1.2% de nano-plata, 0.8-1.2% de acetato de clorhexidina, 0.2-1.6% de vitamina E, 6-18% de glicerina, 0.8-2.0% de un cemento de ionómero de vidrio, 0.5-3.0% de carbómero de matriz de gel, y 1,0-5,5% de trietanolamina. El gel bacteriostático no contiene ningún conservante químico y es seguro. Este documento difiere de la presente invención en que emplea varias plantas para realizar el gel bacteriostático, mientras que el producto de la presente invención gracias a la técnica de elaboración, solo emplea Aloe vera en una concentración adecuada y específicamente un extracto de ella para lograr las propiedades esperadas.

En el mismo sentido, encontramos la solicitud de patente identificada como **CN107338497** y titulada ***“AN ANTIBACTERIAL ALOE FIBER”*** que menciona una fibra antibacteriana de Aloe. La fibra antibacteriana de Aloe incluye celulosa regenerada, un componente antibacteriano de Aloe y microesferas de carga de fármaco, en donde el contenido de un extracto de Aloe es 1-20% en peso, el contenido del componente antibacterial de Aloe es 10-15% en peso, y el contenido de la celulosa regenerada es 50-70% en peso. La fibra antibacteriana de Aloe tiene características de duraderas funciones antibacterianas y de lavado de ropa, y supera el problema de que las fibras antibacterianas tradicionales de Aloe son pobres en efectos antibacterianos, cortos en tiempo de acción antibacteriana y no lavable. Como se puede observar, el producto de la presente invención basado en cutícula de Aloe vera, se realiza mediante extracción con una mezcla de solventes en proporciones específicas y ultrasonido, así que se trata de productos diferentes y propósitos distintos.

También, el documento **CN106973956** titulado ***“ENVIRONMENT-FRIENDLY DISINFECTOR FOR TABLEWARE AND PREPARATION PROCESS THEREOF”*** describe un desinfectante amigable con el medio ambiente para vajillas y un proceso de preparación de los mismos. El desinfectante se prepara a partir de los siguientes componentes en partes por peso: 10 a 30 partes de extracto de café, 10 a 20 partes de solución de extracción de angélica china, 4 a 10 partes de solución de extracción de flores de clavo, 4 a 15 partes de solución de extracción de eucalyptus globulus, 4 a 12 partes de solución de extracción de thesium chinensis, 4 a 10 partes de solución de extracción de flores de madreselva, 7 a 15 partes de polvo de cáscara, 8 a 15 partes de jugo de limón, 8 a 17 partes de lavanda, 7 a 15 partes de radix sophorae flavescentis, de 7 a 15 partes de aceite volátil de hoja de artemisa, de 10 a 20 partes de jugo de Aloe, de 8 a 16 partes de aceite de coco alifático de potasio y de 12 a 25 partes de nonilfenol sulfato de sodio y éter de polioxietileno. El proceso de preparación del desinfectante amigable con el medio ambiente es simple; El desinfectante hecho puede usarse para eliminar bacterias en la vajilla; además, no lesiona la piel; como se puede observar, este documento no menciona que el producto se prepare a partir de cutícula de Aloe vera, como el producto de la presente invención, además, el procedimiento descrito en dicho documento no emplea

ultrasonido. También, una diferencia fundamental es que en el documento CN106973956 se utilizan varios extractos para lograr el desinfectante.

De otro lado, el documento de patente **CN106728630** titulado “**ANTIBACTERIAL AND ANTI-INFLAMMATORY COMPOSITION AND PRIVATE PART CARING PRODUCT**” proporciona una composición antibacteriana y antiinflamatoria. La composición antibacteriana y antiinflamatoria se prepara a partir de un antimicrobiano de amplio espectro y un extracto medicinal chino tradicional, en donde el antimicrobiano de amplio espectro se selecciona de acetato de clorhexidina y/o triclosan; el extracto medicinal tradicional chino se selecciona de uno o varios de un primer extracto medicinal tradicional chino, un extracto de pericarpium granati y un extracto de rhizoma coptidis; el primer extracto medicinal tradicional chino se selecciona de una raíz de cholla y un extracto del tallo y/o un extracto de Aloe. En comparación con la técnica anterior, el producto antibacteriano proporcionado por la invención contiene un antimicrobiano de amplio espectro obtenido por una mezcla específica de solventes y no requiere de otros extractos de plantas; además, la composición antibacteriana es segura, suave y libre de irritación. Asimismo, el procedimiento de preparación del documento CN 106728630 no contempla ultrasonido.

Contrario a lo descrito en el arte anterior, la solicitud en estudio suministra un producto antimicrobiano que es capaz de actuar como bactericida de cepas de *E. coli*.

En la literatura científica para dar solución al problema correspondiente a la resistencia de *E. coli*, las investigaciones indican la importancia de profundizar en la búsqueda de antimicrobianos naturales que pueden ser de origen vegetal, animal o microbiano, incluyendo extractos de plantas, péptidos, proteínas, polisacáridos entre otros (Serna & Enríquez, 2013). que puedan ser utilizadas de forma eficaz para la prevención y control de enfermedades causadas por cepas emergentes de *E. coli* (Gresse et al., 2017).

Para dar solución al problema ambiental y la eficiencia económica del procesamiento de *Aloe vera* la solución es dar valor agregado a la cutícula de *Aloe vera* a través de la búsqueda de compuestos de interés en este residuo,

como lo es en este caso las sustancias antimicrobianas. De modo que el objeto principal de la presente invención es la obtención de un antimicrobiano natural extraído de un residuo agroindustrial denominado cutícula de *Aloe vera*, donde dicho antimicrobiano actúe como bactericida de cepas de *E. coli*.

La cutícula de hojas de *Aloe vera* es un residuo verde sólido, fibrosos, generado en la extracción del gel de *Aloe vera*, este residuo se desecha como residuo sólido (Kwon et al., 2011), o es utilizado en la elaboración de compostaje.

DESCRIPCION GENERAL DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la obtención de un antimicrobiano natural extraído de un residuo agroindustrial denominado cutícula de *Aloe vera*, mediante extracción con una mezcla de solventes en proporciones específicas y ultrasonido. El compuesto antimicrobiano tiene actividad antimicrobiana específica contra la bacteria patógena *E. coli*, por lo tanto, puede tener múltiples formas de uso. Para ilustrar los usos se nombrarán algunas de las posibilidades, antimicrobiano para humanos y animales, producto para aplicar en solución y por aspersión a frutas y hortalizas enteras para prevenir contaminaciones bacterianas por manipulación de alimentos, puede añadirse como ingrediente en el diseño de empaques naturales con protección antimicrobiana. Por lo anterior, este desarrollo tiene relevancia en las áreas, ambiental, porque representa un nuevo producto amigable con el medio ambiente, que no representa riesgo para la salud; Medicina Veterinaria porque se está generando una alternativa para el tratamiento de colibacilosis o de cualquier otra enfermedad producida por *E. coli*, Industrial porque permite el desarrollo de empaques con antimicrobianos, Agroindustrial dado que este compuesto puede aplicarse por aspersión a frutas y hortalizas con el fin de minimizar el riesgo de contaminación por manipuladores de alimentos, Medicina humana porque reduciría el problema de resistencia microbiana.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS Y TABLAS

Para aclarar más la invención y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, de acuerdo con los ejemplos preferentes de la

realización práctica del mismo, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un grupo de tablas y figuras en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La Figura 1 presenta fotografías que demuestran la especificidad del antimicrobiano contra cepas de *E. coli*. El extracto cloroformo: metanol: agua en proporción 2:1:1, presentó inhibición del patógeno *E. coli*. Prueba antimicrobiana con cultivo de *L. monocytogenes* B: Prueba antimicrobiana en agar EMB con cultivo de *E. coli*. C: Prueba antimicrobiana con cultivo de *Staphylococcus aureus*. La capacidad mínima inhibitoria del extracto fue del 80%.

La Figura 2 corresponde a una cromatografía de placa delgada de extractos de cutícula y gel de *Aloe vera* corrida con fase móvil de acetato de etilo:metanol:agua revelada con KOH y luz ultravioleta. La primera línea corresponde al extracto acuoso del gel de *Aloe vera*, la segunda a un extracto metanol-agua de cutícula de *Aloe vera*, la tercera a un extracto acetona-agua de cutícula de *Aloe vera* y la cuarta línea al extracto metanol de cutícula de *Aloe vera*.

Muestra el resultado del análisis preliminar del contenido de quinonas en los extractos obtenidos de cutícula de hojas de *Aloe vera*. En esta Figura 2 se observan manchas de coloración rojiza que corresponden presuntivamente a compuestos como antraquinonas, antronas o antranoles, los cuales producen coloración violeta-roja oscura o amarilla cuando son revelados con solución de KOH al 10% en etanol. En cuanto a las antraquinonas se ha demostrado su uso como agentes antimicrobianos y antivirales (Kwon et al., 2011, Sánchez et al., 2017).

La Figura 3 muestra una placa cromatográfica para detección quinonas y cumarinas en alícuotas de extractos de cutícula de *Aloe vera* obtenidos con la mezcla cloroformo:metanol:agua (2:1:1), y revelada con KOH etanólico al 10 % y sometida a luz UV a 365 nm. Se utilizaron antronas como marcadores para quinonas y esculina como marcador para cumarinas. La figura 3 muestra dos extracciones (denominadas extracción 2a y extracción 2b). Para la extracción 2a se pesó aproximadamente 1 g de la muestra, se adicionaron 10 ml de metanol y

se sometieron a ultrasonido durante 15 minutos. Para la extracción 2b se pesaron aproximadamente 1 g de la muestra, se adicionaron 10 mL de diclorometano y se sometieron a un proceso de extracción por ultrasonido por 15 minutos. El extracto de la extracción 2b se normalizó con un volumen de 10 mL de diclorometano. Para las extracciones 2^a y 2b se tomó una placa HPTLC de 10x5 cm, para una longitud de elución 8 cm, y se sembraron 20 µL de las dos extracciones sin dilución en la placa.

La presencia de quinonas en cutícula de hojas de *Aloe vera* soporta la actividad antimicrobiana del extracto de cutícula de *Aloe vera*.

Tabla 1 muestra el diámetro promedio de Feret (mm), y el área de inhibición en mm² de la actividad antimicrobiana del extracto acuosa de cutícula de *Aloe vera* contra *E. coli*.

Microorganismo patógeno	Diámetro de Feret (mm)	Área de inhibición en mm ²
E coli	7.12±0,2	0.039

La Tabla 2 muestra la presencia (+) o ausencia (-) de los metabolitos de interés en la marcha fitoquímica por HPTLC de quinonas.

Metabolito	Muestras		
	Muestra 1		Muestra 2
	{}	1:2	Extracto 2 ^a y 2b
Quinonas	±	+	++
Terpenos y/o esteroides	-		±
Cumarinas	-		-

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere Al método de obtención de un antimicrobiano natural extraído de un residuo agroindustrial denominado cutícula de *Aloe vera*, mediante extracción con una mezcla de solventes en proporciones específicas y ultrasonido.

La obtención del antimicrobiano obtenido del residuo agroindustrial cutícula de *Aloe vera* se obtiene mediante las siguientes etapas:

Etapas 1: Obtener y acondicionar residuos agroindustriales correspondientes a cutículas obtenidas de hojas de Aloe vera

Lavar hojas de *Aloe vera* con abundante agua y desinfectar por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm por 10 minutos.

Separar la cutícula haciendo cortes en los bordes exteriores, en las puntas y en la base de las hojas. Retirar el gel y trabajar con el residuo agroindustrial llamado cutícula.

Congelar las cutículas a -80°C

Secar las cutículas por liofilización a una presión de vacío de 2.1 y 12 Pa, preferiblemente 12 Pa., temperatura en el condensador de $(-40--50^{\circ}\text{C})$, preferiblemente -50°C (liofilizador Labconco freezone 6 plus, USA). Pueden utilizarse otros métodos de secado

Moler las cutículas secas en un molino, preferiblemente de cuchillas (IKA, Alemania).

Almacenar las cutículas molidas en recipientes herméticamente sellados para posterior uso.

Etapas 2: Extraer compuestos de cutículas de hojas de Aloe vera

Preparar extractos acuosos utilizando por lo menos 10 g de cutículas secas, sin embargo, puede utilizarse cualquier cantidad de residuo seco de cutícula.

Realizar una mezcla de solventes utilizando cloroformo-metanol-agua en proporción 2:1:1 respectivamente.

Añadir la mezcla de solventes al residuo seco de cutícula en proporción 10:1 respectivamente

Someter la mezcla (solventes + residuo seco de cutícula) a ultrasonido (Branson Scientific Ultrasonic 2510) durante 5 a 15 minutos, preferiblemente 10 minutos a temperatura de 25° a 28°C.

Obtener el extracto

Filtrar el extracto preferiblemente con papel filtro Whatman No. 1

Concentrar el extracto utilizando un rotavapor (Heidolph Rotary Evaporator, Laborota 4010).

Pasteurizar el extracto sometiendo la mezcla al baño de maría hasta que el extracto alcance temperatura de 68°C por 30 minutos (pero puede utilizarse cualquier otro método de pasteurización)

Congelar el extracto a -20°C (pero puede congelarse a cualquier temperatura menor a -20°C).

Liofilizar el extracto a una presión de vacío de 2.1 y 12 Pa, preferiblemente 12 Pa., temperatura en el condensador de (-40--50°C), preferiblemente -50°C (liofilizador Labconco freezone 6 plus, USA).

Almacenar el extracto liofilizado en ultracongelador a -30 °C, o en nevera a -20°C (pero puede utilizarse cualquier temperatura por debajo de -20°C).

Etapas 3: Medir la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de cutículas contra el patógeno E. coli

Utilizar una cepa comercial de *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 para medir la actividad antimicrobiana del extracto

Preparar placas estériles de agar Eosina y Azul de Metileno (EMB), de 5 mm de espesor.

Sembrar sobre la superficie de las placas 0.1 µl de *E. coli* ATCC® 25922 en solución acusa.

Impregnar discos de papel absorbente con 10 μ l del extracto obtenido en la Etapa 2

Incubar las placas a 37 °C por 24 horas

Tomar fotografías para observar la acción del compuesto antibacteriano contra *E. coli*.

Procesar las imágenes fotográficas en un software de análisis de imágenes (Imagen j 1.40 g, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), u otro software de imágenes.

Calcular en el software el área de inhibición del crecimiento del patógeno *E. coli* y calcular mediante el software el diámetro de Feret.

Etapa 4: Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Preparar diferentes concentraciones del extracto (80%, 40%, 16%, 6.4%, 2,6% y 1%)

Preparar una solución acuosa del patógeno *E. coli* a una concentración de microorganismos de 10^8 UFC/ml.

Seguir el mismo procedimiento descrito en la Etapa 3

Determinar hasta que dilución el extracto inhibe el microorganismo.

Etapa 5: Medir de la especificidad de la actividad antimicrobiana del extracto

Utilizar otros microorganismos patógenos por ejemplo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923TM* y *Listeria monocytogenes*.

Seguir los procedimientos descritos en las Etapas 3 y 4.

Etapa 6: Determinar los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana

Realizar un estudio químico sistemático empleado la técnica cromatográfica HPTLC (High performance thin layer chromatography) en conjunto con un procedimiento de derivatización para la detección de metabolitos secundarios presentes en los extractos como quinonas, terpenos, esteroides y cumarinas.

Realizar el estudio a dos alícuotas de extractos de cutícula de *Aloe vera* obtenidos con la mezcla cloroformo:metanol:agua (2:1:1) (descrita en la Etapa 2). Denominar (muestra 1a y 1 b). Para la muestra 1a y 1 b tomar alícuotas independientes de 200 µL. Posteriormente en placas HPTLC de 10x5 cm, para una longitud de elución 8 cm, aplicar 20 µL de la muestra 1a sin dilución, y de la muestra 1b con una dilución 1:2 en etanol.

Realizar el mismo estudio a una muestra de cutícula de *Aloe vera* y denominar como muestra 2. A la muestra 2 hacer dos extracciones (denominadas extracción 2a y extracción 2b). Para la extracción 2a pesar aproximadamente 1 g de la muestra, adicionar 10 mL de metanol y someter a ultrasonido durante 15 minutos. Para la extracción 2b pesar aproximadamente 1 g de la muestra, adicionar 10 mL de diclorometano y someter a un proceso de extracción por ultrasonido por 15 minutos. Normalizar el extracto de la extracción 2b con un volumen de 10 mL de diclorometano. Para las extracciones 2^a y 2b tomar una placa HPTLC de 10x5 cm, para una longitud de elución 8 cm, y sembrar 20 µL de las dos extracciones sin dilución en la placa.

Para detección de quinonas en los extractos 1^a, 1b, 2^a y 2b utilizar un sistema de elución compuesto por cloroformo-metanol-agua en proporción 35:23:10 y revelador de KOH al 10% en etanol.

Para detección de terpenos y esteroides y cumarinas y quinonas utilizar como sistema de elución tolueno-acetato de etilo en proporción 93:7, y utilizar anisaldehído-H₂SO₄ para revelar terpenos y esteroides, y KOH al 10% en etanol para revelar cumarinas y quinonas.

DIFERENTES FORMAS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Se presentan los siguientes ejemplos para exponer con mayor detalle la versatilidad en el método de extracción de la presente invención y cómo esto

representa una ventaja para la misma. Lo cual permite una interpretación de una manera más amplia de las ventajas que el antibacteriano representa. Es posible diseñar variadas combinaciones de métodos y solventes de extracción, al igual que otras formas de realización de la evaluación antimicrobiana de la invención. Por lo tanto, se propone que las reivindicaciones incluyan cualquiera de tales combinaciones o modificaciones.

La obtención del antimicrobiano obtenido a partir del residuo agroindustrial cutícula de *Aloe vera*, presenta actividad antimicrobiana contra *E. coli*, sin embargo, para la obtención del antimicrobiano también podrían utilizarse cutículas de diferentes frutos cítricos como son la cutícula de limón, naranja, mango y guayaba. Dichas cutículas o epicarpio se pueden procesar mediante el método de extracción descrito con anterioridad y presentar actividad antimicrobiana contra *E. coli*.

Forma de realización 1:

La metodología de extracción se realiza como en la invención o como ejemplo se puede aplicar una extracción tipo soxhlet donde la etapa 1 será igual a la descrita, sin embargo, la etapa 2 cambia de la siguiente manera:

Etapas 2: Extraer compuestos de cutículas

Preparar extractos acuosos utilizando por lo menos 10 g de cutículas de frutos cítricos secos.

Realizar una mezcla de solventes utilizando cloroformo-metanol-agua en proporción 2:1:1 respectivamente.

Añadir la mezcla de solventes al residuo seco de cutícula de cítricos en proporción 10:1 respectivamente

Someter la mezcla (solventes + residuo seco de cutícula de cítricos) a extracción soxhlet donde se pueden hacer dos corridas o más de ser necesario, a una temperatura entre 60 y 70°C. Hasta obtener el extracto

Pasteurizar el extracto sometiendo la mezcla a baño de maría hasta que el extracto alcance temperatura de 68°C por 30 minutos (pero puede utilizarse cualquier otro método de pasteurización)

Congelar el extracto a -20°C (pero puede congelarse a cualquier temperatura menor a -20°C).

Liofilizar el extracto a una presión de vacío de 2.1 y 12 Pa, preferiblemente 12 Pa., temperatura en el condensador de (-40--50°C), preferiblemente -50°C (liofilizador Labconco freezone 6 plus, USA).

Almacenar el extracto liofilizado en ultracongelador a -30 °C, o en nevera a -20°C (pero puede utilizarse cualquier temperatura por debajo de -20°C).

Forma de realización 2:

Homogenizar las cutículas de cítricos con etanol al 95%

Dejar en reposo la mezcla 48 horas en un lugar oscuro

Filtrar al vacío la mezcla con papel Watman Nro. 52

Concentrar la mezcla en rotavapor

Liofilizar lo obtenido en el rotaevaporador, preferiblemente 12 Pa, temperatura en el condensador de preferiblemente -50°C (liofilizador Labconco freezone 6 plus, USA).

Almacenar el extracto liofilizado en ultracongelador a -30 °C