



**Universidad  
Norbert Wiener**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA  
Y BIOQUÍMICA**

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EFECTO ANTIBACTERIANO  
DEL ACEITE ESENCIAL DE CASCARAS DE *Citrus sinensis*  
variedad *Valencia Late***

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO**

Presentado por:

Bach. Luque Lipa, Miguel

Bach. Márquez Vega, Rosalinda

Asesor:

Mg. Ramos Jaco Antonio Guillermo

Lima – Perú

2019

### **Dedicado a:**

A Dios por ser el eje principal de mi existencia, ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para alcanzar mis metas.

A la memoria de mi madre, quién me dio la vida y fue ejemplo de perseverancia y trabajo.

A Miguel Márquez Espinoza, mi padre por ser un incondicional apoyo económico, emocional y la fortaleza para seguir adelante cuando flaqueaba en mis objetivos.

A Fátima Massiel y John Jairo, mis hijos, mis dos motores y motivos de seguir siempre adelante.

**Br. Rosalinda Márquez Vega**

**Dedicado a:**

En primer lugar a Dios por guiarme cada día para culminar este reto profesional

A mis padres Victoria y Rufino, por su amor, protección y entrega total para llegar a ser un gran profesional de éxito.

A mi hija Maricielo Nicole, por ser la razón de mi existencia y superación.

**Br. Miguel Luque Lipa**

## **Agradecimientos:**

A nuestra alma mater la Universidad Norbert Wiener por brindarnos todas las facilidades para el desarrollo de la tesis.

A nuestro asesor Mg. Antonio Ramos Jaco, por su colaboración en la ejecución y término de este trabajo de Tesis.

A todas las personas que colaboraron de una u otra manera para la culminación de este trabajo de tesis nuestro más profundo agradecimiento.

Un agradecimiento especial a Edgar Tapia Manrique un gran amigo y persona importante en la culminación de esta tesis

Muy agradecidos.

**Br. Márquez Vega Rosalinda**

**Br. Luque Lipa Miguel**

## ÍNDICE GENERAL

Resumen

Summary

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Planteamiento del problema.....	1
1.2. Formulación del problema.....	2
1.3. Justificación .....	2
1.4. Objetivos.....	3
1.4.1. Objetivo General .....	3
1.4.2. Objetivos Específicos: .....	3
1.5. Variables.....	4
1.5.1. Variable independiente .....	4
1.5.2. Variable dependiente .....	4
1.6. Hipótesis .....	4
<b>II. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
2.1. Antecedentes de la investigación .....	4
2.1.1. Antecedentes Nacionales.....	4
2.1.2. Antecedentes Internacionales.....	7
2.2. Bases teóricas.....	10
2.2.1. Clasificación taxonómica <i>Citrus Sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> .....	10
2.2.2. Descripción botánica de <i>Citrus sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> .....	11
2.2.3. Distribución geográfica de <i>Citrus sinensis</i> .....	11
2.2.4. Usos de <i>Citrus sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> .....	12
2.2.5. Aceites esenciales.....	13
2.2.6. Antioxidantes y oxidantes.....	16
2.2.7. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
2.2.8. <i>Escherichia coli</i> .....	22

2.2.9. Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana .....	23
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>25</b>
3.1 Tipos de investigación: .....	25
3.2. Población y muestra .....	25
3.3. Materiales, solventes y reactivos .....	26
3.4. Métodos .....	27
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
4.1. Rendimiento para la obtención del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> . .....	32
4.2. Prueba de miscibilidad del aceite esencial de cáscaras <i>Citrus sinensis</i> variedad Valencia Late. ....	32
4.3. Determinación de la densidad relativa y metabolitos secundarios de <i>Citrus sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> . .....	33
4.4. Comprobación de la actividad antioxidante del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> . .....	34
4.5 Efecto Antibacteriano frente a la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	36
4.6 Efecto Antibacteriano frente a la cepa de <i>Escherichia coli</i> . ....	38
4.7 Contrastación de hipótesis de la actividad antimicrobiana frente a cepas de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	40
4.8 Contrastación de hipótesis del efecto antibacteriano frente a cepas de cepas de <i>Escherichia Coli</i> .....	43
4.8 Contrastación de hipótesis de la actividad antioxidante .....	45
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>
<b>IX. ANEXOS .....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Fruto de Citrus sinensis variedad Valencia Late	11
Figura 2 Distribución geográfica de la producción de los principales Cítricos	13
Figura 3 Formación de los radicales libres y el daño que produce en el ácido desoxirribonucleico (ADN)	18
Figura 4 Curva espectral del radical DPPH en sus estados de oxidación y reducción.	20
Figura 5 Curva espectral de diversas concentraciones del radical catiónico ABTS	21
Figura 6 Imagen de Staphylococcus aureus por microscopia electrónica	23
Figura 7 Imagen de Escherichia coli por microscopia electrónica	24
Figura 8 Gráfica de dispersión del % inhibición del radical DPPH vs las concentraciones del aceite esencial de cáscaras de Citrus Sinensis variedad Valencia Late	37
Figura 9 Gráfica de dispersión del % inhibición del radical DPPH vs las concentraciones del estándar Trolox.	38
Figura 10 Nivel medio y dispersión del halo de inhibición sobre cepas de Staphylococcus aureus.	40
Figura 11 PEIR del aceite esencial de cáscaras de Citrus sinensis variedad Valencia Late frente a cepas de Staphylococcus aureus.	40
Figura 12 Nivel medio y dispersión del halo de inhibición sobre cepas de Escherichia coli.	42

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Rendimiento del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i>	33
Tabla 2. Prueba de miscibilidad del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> .	33
Tabla 3. Densidad relativa del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> determinado por picnometría.	34
Tabla 4. Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo de cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i>	35
Tabla 5. Actividad antioxidante del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> mediante el ensayo de DPPH	36
Tabla 6. Actividad antioxidante del estándar Trolox <sup>®</sup> mediante el ensayo de DPPH	37
Tabla 7. Efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i>	38
Tabla 8. Prueba para la actividad antioxidante del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> frente al radical DPPH.	38
Tabla 9. Prueba de comparaciones múltiples para la actividad antioxidante del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> frente al radical DPPH	39
Tabla 10. Sub conjuntos homogéneos para la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Citrus Sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> frente al radical DPPH	40
Tabla 11. Prueba para la actividad antioxidante del estándar Trolox frente al radical DPPH.	40
Tabla 12. Prueba de comparaciones múltiples para la actividad antioxidante del estándar Trolox frente al radical DPPH	41
Tabla 13. Sub conjuntos homogéneos para la actividad antioxidante del estándar Trolox frente al radical DPPH	42
Tabla 14. Estadística descriptiva del efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Citrus Sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> frente a <i>Staphylococcus Aureus</i>	42
Tabla 15. Prueba de homogeneidad de varianzas	43
Tabla 16. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis de la evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> frente a <i>Staphylococcus Aureus</i>	43
Tabla 17. Prueba de Comparaciones múltiples de la evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	44
Tabla 18. Subconjunto de datos de la evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Tabla 19. Estadística descriptiva de la evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> frente a <i>Escherichia</i>	46



*coli*

Tabla 20. Prueba de homogeneidad de varianza

Tabla 21. Prueba de la evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late* frente a *Escherichia coli* 47

Tabla 22. Prueba de Comparaciones múltiples de la evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late* frente a *Escherichia coli* 48

Tabla 23. Subconjunto de datos de la evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late* frente a *Escherichia coli* 49

## ABREVIATURAS

**Abs:** Absorbancia

**ABAP:** Hidrocloruro de 2,20-azo-bis (2-amidino-propano)

**ABTS:** Ácido 2,2', azino- bis (3-etilbenzotiazolin)-6- sulfónico

**cc:** concentración

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl

**DS:** Desviación estándar

**FRAP:** Poder reductor antioxidante férrico

**L:** Litros

**mL:** Mililitros

**mm:** milímetros

**mg/kg:** Miligramos por kilogramo de peso.

**PEIR:** Porcentaje de Efecto Inhibitorio Relativo

**TEAC:** Capacidad antioxidante equivalente al Trolox

**TRAP:** Fosfatasa ácida resistente al tartrato

**TPTZ:** 2,3,5-trifenil-1,3,4-triaza-2-azoniaciclopenta-1,4-dieno

**Trolox:** Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2- carboxílico

**µg/mL:** Microgramos por mililitro.

**v/p:** Relación volumen, peso.

**v/v:** Relación volumen, volumen.

## **RESUMEN**

La especie vegetal *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*, es una planta originaria de las regiones tropicales y subtropicales. Es uno de los cultivos más importantes del mundo por la elevada demanda del fruto y derivados. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antioxidante y efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*. La extracción del aceite esencial se realizó por destilación por arrastre a vapor de agua. El efecto antibacteriano se evaluó contra las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 12228 siguiendo el método por difusión en agar y la actividad antioxidante fue determinado por el método del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl). Para los resultados en el efecto antibacteriano se utilizó prueba no paramétrica de Kruskal Wallis debido a que las dispersiones observadas en los grupos no fueron homogéneas. También se realizaron comparaciones múltiples usando la técnica de Games Howell. Respecto a la actividad antioxidante en el aceite esencial de cáscaras *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* se determinó el IC<sub>50</sub> (concentración mínima necesaria para inhibir al 50% el DPPH) mediante un ajuste de regresión lineal. Los resultados fueron ilustrados mediante diagramas de barras y gráficos de cajas. El rendimiento de obtención del aceite esencial fue de 1,14%. En la evaluación del efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* se reportó un halo de inhibición de 13,5; 13,30 y 13,0 mm para las concentraciones de 70; 50 y 30% del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia late* respectivamente y el efecto antibacteriano contra *Escherichia coli* evidenció halos inhibición de 7,9; 7,6 y 7,1 mm para las concentraciones de 70; 50 y 30, %. Se utilizó sulfadiazina de plata al 1% como control positivo, reportando halos de inhibición de 16 y 7,6 mm para *S. aures* y *E. coli*, respectivamente. El IC<sub>50</sub> para el aceite esencial de cáscaras *Citrus sinensis* variedad *Valencia late* fue de 49,87 ug/mL y para el estándar Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) fue de 2,523 ug/mL. Se concluye que el aceite esencial de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* presenta efecto antibacteriano frente a las dos cepas evaluadas y actividad antioxidante frente al radical DPPH.

**Palabras clave:** actividad antioxidante, antibacteriana, aceite esencial, *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.

**ABSTRACT**

The plant species is *Citrus sinensis* variety *Valencia Late*; it is a plant native to tropical and subtropical regions. It is one of the most important crops in the world due to the high demand for the product and derivatives. This research work aimed to evaluate the antioxidant and antibacterial effect of the essential oil of *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* peels. The essential oil was extracted by steam distillation. The antibacterial effect was evaluated against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* following the agar diffusion method and the antioxidant activity according to the DPPH radical method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). For the results in the antibacterial effect, the non-parametric Kruskal Wallis was used because the dispersions observed in the groups were not homogeneous. Multiple comparisons were also made using the Games Howell technique. Regarding the antioxidant activity in the essential oil of *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* peels, the IC<sub>50</sub> (minimum concentration necessary to inhibit DPPH by 50%) was determined by means of a linear regression adjustment. The results were illustrated by bar charts and box plots. The yield of obtaining the essential oil was 1.14%. In the evaluation of antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* an inhibition halo of 13.5 was reported; 13.3 and 13 mm for quantities of 70; 50 and 30% of the essential oil of *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* (orange) respectively and the antibacterial activity against *Escherichia coli* evidence halos inhibition of 7.9 ; 7.6 and 7,1 mm for the variables of 70; 50 and 30% Plant sulfadiazine was considered 1% as a positive control, reporting inhibition halos of 16 and 7.6 mm for *S. aures* and *E. coli*, respectively. The IC<sub>50</sub> for the essential oil of *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* was 49.870 ug / mL and for the standard Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was 2,523 ug / ml. It is concluded that the essential oil of *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* presents antibacterial effect against the two strains evaluated and antioxidant activity in against the DPPH radical.

**Keywords:** antioxidant activity, antibacterial, essential oil, *Citrus Sinensis* variety *Valencia Late*

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Planteamiento del problema

En la actualidad, los aceites esenciales tienen propiedades beneficiosas para la salud, existiendo un incremento en su demanda en aplicaciones farmacéuticas y médicas. A diferencia de la mayoría de medicinas y medicamentos convencionales, los aceites esenciales comúnmente no tienen efectos secundarios importantes, además la creciente inclinación de los consumidores hacia productos naturales y orgánicos también está llevando a un mayor uso de aceites esenciales en cosméticos, alimentos y bebidas. Se estima el uso actual de más de 250 tipos de aceites esenciales, por un valor aproximado de 1,2 billones de dólares que se comercializan anualmente en el mercado internacional. La producción mundial para los aceites esenciales está estimada en 226 900 toneladas, y se provee aumentar un 8,6% en el periodo comprendido entre 2019 a 2025<sup>1</sup>.

El uso de varios agentes antibacterianos a dosis elevadas puede causar toxicidad en humanos. Esto ha llevado a los investigadores a descubrir nuevas moléculas clave contra las cepas bacterianas. En este sentido, los aceites esenciales de plantas y sus principales componentes químicos son candidatos potenciales como agentes antibacterianos. Se ha informado que varios tipos de aceites esenciales y sus componentes químicos principales de varias plantas medicinales y aromáticas poseen una amplia gama de potenciales inhibidores bacterianos<sup>2</sup>.

El Perú ocupa el cuarto lugar en producción de cítricos después de Brasil, Sudáfrica y Argentina. El 10% de los cítricos producidos en el Perú se exportan, es decir, que el 90% se consume en el mercado nacional. La producción nacional de jugos, néctares y refrescos tuvo un crecimiento de 375 800 toneladas métricas para fines del año 2014<sup>3,4</sup>.

En los últimos años, negocios como las juguerías están en crecimiento en diversas partes del Perú. Tanto la industria de cítricos como de juguerías conllevan a la generación de residuos orgánicos tales como flavedos o cáscaras, de diversos cítricos que terminan siendo desechados, sin embargo, estos flavedos tienen un alto contenido

de sustancias aromáticas que permitirían desarrollar subproductos como los aceites esenciales<sup>4</sup>.

Los aceites esenciales contienen compuestos fenólicos a los cuales se les atribuye propiedades antisépticas, bactericidas y antioxidantes.<sup>5</sup>

La aparición de cepas resistentes a los antibióticos comerciales en los últimos tiempos, está creando la necesidad de buscar otras estrategias o alternativas para combatir las infecciones causadas por microorganismos<sup>6</sup>.

La producción industrial del aceite esencial a partir de residuos, contribuye al aprovechamiento de los desechos reduciendo el problema ambiental de residuos sólidos, a su vez permitiría ahorrar al país divisas que son invertidas en la importación de aceites esenciales y generar una cadena productiva con valor agregado<sup>7</sup>.

En nuestra ciudad la cáscara de naranja es desechada a convertirse en basura. La necesidad de proteger al medio ambiente y mantenerlo intacto, enfoca la reutilización de productos orgánicos de desecho, como la cáscara de los cítricos del cual se puede obtener aceite esencial.

Por lo anteriormente mencionado existe la necesidad de explorar la reutilización, aprovechamiento de cáscaras y evaluar su actividad antioxidante y antibacteriana frente a bacterias Gram negativos, Gram positivos generando nuevas alternativas de tratamientos a infecciones producidas por este tipo de microorganismos.

## **1.2. Formulación del problema**

¿El aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*, tendrá actividad antioxidante y efecto antibacteriano?

## **1.3. Justificación**

En el Perú, la acumulación de residuos sólidos y orgánicos se ha convertido un problema de salud pública, las mismas que conllevan a diferentes enfermedades y mayor contaminación ambiental. Los antioxidantes son compuestos los cuales pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas frenando la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres y las enfermedades bacterianas este hecho ha impulsado a encaminar una búsqueda de nuevos productos terapéuticos ante la necesidad de proteger al medio ambiente y mantenerlo intacto<sup>1-5</sup>.

Ello nos enfoca al uso de productos orgánicos de desecho como las cáscaras de los cítricos la cual contienen el aceite esencial, conformado por metabolitos secundarios, dichos compuestos han atraído la atención a nivel industrial debido a su actividad antioxidante y efecto antibacteriano<sup>26</sup>.

Actualmente, la demanda de los aceites esenciales es incipiente en el Perú, por las altas características de calidad exigidas al producto y el alto nivel de integración a base de investigaciones científicas para tener con la cadena de valor. Por lo cual este trabajo propone la disminución de residuos orgánicos y productos derivados aprovechables, permitiendo contar con un recurso natural alternativo con propiedades antioxidantes y tratamiento de infecciones producidas por bacterias a partir de un producto natural e inocuo para la salud<sup>3</sup>.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo General**

- Evaluar la actividad antioxidante y efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.

### **1.4.2. Objetivos Específicos:**

- Obtener el aceite esencial de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late* por el método de destilación por arrastre de vapor.
- Determinar por análisis cualitativo la presencia de metabolitos secundarios en el aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.

- Determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* por el método de DPPH.
- Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late* frente a *Staphylococcus aureus*, *in vitro*.
- Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late* frente a *Escherichia coli*, *in vitro*.

## 1.5. Variables

### 1.5.1. Variable independiente

El aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.

### 1.5.2. Variable dependiente

La actividad antioxidante y efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.

## 1.6. Hipótesis

El aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* presenta actividad antioxidante y efecto antibacteriano.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes de la investigación

#### 2.1.1. Antecedentes Nacionales

Porras Katia. (2019), Tesis: Determinación de la composición química y evaluación de la actividad antibacteriana sinérgica *in vitro* de la asociación de dos aceites esenciales



del género *Citrus* de la zona de Chanchamayo. La investigación tuvo como objetivo determinar la composición química y evaluar la actividad antibacteriana sinérgica de dos aceites esenciales, *Citrus sinensis* L. Osbeck “naranja valencia” y *Citrus japonica* Thumb. “naranja enana”. La extracción de los aceites esenciales a partir del flavedo se realizó por destilación arrastre de vapor de agua obteniéndose. La determinación de los compuestos químicos se realizó por el método de Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM). La determinación de la actividad antibacteriana individual *in vitro* se realizó mediante microdilución colorimétrica. Como resultado se obtuvieron los rendimientos fueron de 0.36 y 0.12 % v/p para *Citrus sinensis* L. Osbeck y *Citrus japonica* Thumb, respectivamente siendo los componentes con mayor abundancia en el cromatograma de identificación: D-Limoneno,  $\beta$ -Mirceno y  $\alpha$ -Pino para ambos aceites esenciales. Se concluye que el aceite esencial demostró actividad significativa frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* cepa-clínica y *Staphylococcus epidermidis* cepa-clínica. La investigadora concluye que las cepas que tuvieron resultados significativos a la actividad antibacteriana individual evidencia sinergismo mediante el índice de concentración<sup>8</sup>.

Guillermo Villa. (2017), Tesis: “Composición química del aceite esencial de *Citrus paradisi* “Toronja”, actividad antioxidante y determinación de la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*”. El objetivo de la investigación fue determinar la composición química del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad. “toronja”, actividad antioxidante y antibacteriana *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*. Según la metodología el aceite esencial se trató en un sistema de hidrodestilación por arrastre de vapor de agua a temperatura y presión controlada, realizándose asimismo el análisis preliminar del aceite esencial y sus propiedades fisicoquímicas. El análisis cualitativo de la composición química realizado en Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas (CG/EM), la actividad antioxidante mediante el uso de los radicales DPPH- ABTS y la actividad antibacteriana mediante difusión en agar. Como resultado el rendimiento de 0,13 mL% v/p, se destacan los siguientes componentes químicos en el aceite esencial: dieciséis monoterpenos, cinco sesquiterpenos, dos ácidos orgánicos, cuatro aldehídos, un éster, cinco hidrocarburos, un fenilpropanoide. Se concluye que el aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad no posee actividad antioxidante frente al patrón estándar de Trolox®. La actividad antibacteriana frente a

*Streptococcus mutans* ATCC 35668 se enfrentó al 100, 50 y 25 % del aceite esencial, utilizando el antibacteriano ciprofloxacino como control positivo. El aceite esencial presenta baja actividad antioxidante y antibacteriana frente al *Streptococcus mutans* ATCC 35668<sup>9</sup>.

Ochoa K y colaboradores en el año 2015, realizaron la extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). La investigación tuvo como objetivo extraer, caracterizar y evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya) frente a *Escherichia Coli* y *Staphylococcus Aureus* ATCC 29923. Según la metodología las muestras (hojas y tallos) se recolectaron en el distrito de Puquio, provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho. El aceite esencial se obtuvo por destilación por arrastre con vapor de agua, a partir de las hojas y tallos desecados de *S. graveolens*. La muestra extraída fue caracterizada a través de ensayos físicos. La composición química del aceite se evaluó mediante cromatografía de gas con detector de masa (CG-SM). La actividad antibacteriana del aceite de *S. graveolens* se realizó por el método de difusión en agar en pocillos, utilizando cepas de microorganismos Gram positivo como *S. Aureus* y Gram negativo como *E. Coli*. Como resultados el aceite esencial presentó un rendimiento de 1,26 % (p/p), mostró actividad antibacteriana marcada y moderada, para *S. Aureus* y *E. Coli*, respectivamente, observándose formación de halos de inhibición para concentraciones del aceite esencial a 80, 90 y 100 %. Se concluye que esta investigación con el método de difusión en agar en pocillos, utilizando cepas de microorganismos como *S. Aureus* y *E. Coli* las mismas a usar en nuestra investigación, pero con diferentes concentraciones<sup>10</sup>.

Mercado M y colaboradores en el año 2014, en la Universidad Nacional de Trujillo estudiaron la sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a concentración de aceite de *Citrus reticulata* variedad Satsuma “mandarina”. El objetivo de la investigación fue estudiar la actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarinas obtenidas de las cáscaras (flavado) frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus Aureus*, para lo cual se utilizó diferentes concentraciones del aceite de *Citrus reticulata*. Según su metodología el aceite se obtuvo por destilación por arrastre con vapor de agua a partir del flavado de la mandarina. Para determinar la sensibilidad antibacteriana se emplearon cultivos de *S. Aureus* y de *P. aeruginosa*. La

susceptibilidad de estos microorganismos se evaluó por el método de difusión en agar usando concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100% del aceite esencial, como controles se utilizó la Vancomicina y Ciprofloxacina para *S. Aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente. Como resultado se evidencio que el *S. Aureus* y *P. aeruginosa* presentaron mayor sensibilidad a las concentraciones 60, 80 y 100% de aceite de *C. reticulata* var. *Satsuma* “mandarina”; *P. aeruginosa* es más sensible a Ciprofloxacino que a las concentraciones del aceite, mientras que *S. Aureus* presentó mayor sensibilidad a la concentración del 100% de aceite que al control positivo de Vancomicina. Se concluye que los cultivos de *S. Aureus* y *P. aeruginosa* evaluados son susceptibles a las diferentes concentraciones ensayadas del aceite esencial obtenido de *C. reticulata* var. *Satsuma* “mandarina” *in vitro* <sup>11</sup>.

Juárez J y colaboradores en el año 2010, estudió la composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *citrus Sinensis l.* (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. El objetivo de la investigación fue caracterizar los componentes químicos del aceite esencial de *Citrus Sinensis L.* (Naranja dulce), evaluar su actividad antibacteriana y formular formas farmacéuticas, principalmente de uso local. Según su metodología se utilizó un sistema de hidrodestilación con arrastre de vapor de agua; también se realizaron los ensayos de miscibilidad y determinación de constantes físicas. La composición química se determinó por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masa (CG/EM), la determinación de la actividad antibacteriana se realizó por el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Como resultado se destaca que el cromatograma señales espectrales de identificación en la elucidación de limoneno,  $\beta$ -linalol, decanal, mayoritariamente. Además, se demostró susceptibilidad antibacteriana significativas a concentraciones de 100 y 50%, para Gram positivos; resultando negativo frente a bacterias Gram negativos (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). Se concluye que el aceite esencial de *Citrus Sinensis L.* posee actividad antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermis*)<sup>12</sup>.

### 2.1.2. Antecedentes Internacionales

Saquina D. (2018), realizó la investigación: “Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de naranja (*citrus Sinensis*) sobre la cepa de *Staphylococcus aureus*”,

El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) sobre la cepa de *S. aureus* ATCC® 25904. Según la metodología el aceite esencial se obtuvo mediante destilación por arrastre de vapor de agua a partir del flavedo de naranja, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por microdilución en caldo. Como resultado, la inhibición del crecimiento bacteriano fue observada entre la concentración al 30% y 50%, la prueba de sensibilidad mostró resultados de inhibición a partir de concentraciones al 50%, al presentar zonas de inhibición de 11,16 mm; 11,26 mm y 14,84 mm de halo. El investigador concluye que los tratamientos al 50%, 70% y 90% son efectivos, siendo el 50% y 70% estadísticamente iguales a un  $p = < 0,05$ . La concentración al 90% tiene mayor efectividad sobre la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*<sup>13</sup>.

Argote V y colaboradores en el año 2017, realizó la *evaluación* de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. El objetivo de la investigación fue determinar la capacidad antibacteriana de tres aceites esenciales (eucalipto, cáscara de limón y mandarina ante *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia Coli* a través de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB). Según su metodología la actividad antibacteriana se evaluó utilizando el método de microdilución en caldo colorimétrico. Como resultados se hallaron los (CMI y CMB 6,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ante *Staphylococcus Aureus*), (CMI y CMB 13,2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ante *Escherichia Coli*). Este estudio se describe la capacidad antibacteriana de dos especies vegetales (cáscara de limón y cáscara de mandarina). Los investigadores concluyen que los tres aceites esenciales tienen capacidad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, con mejores resultados del aceite esencial de eucalipto y cáscara de mandarina<sup>14</sup>.

Ehigbai O y colaboradores, realizaron la investigación titulada: "Actividades fotoquímicas, antimicrobianas y antioxidantes de diferentes concentrados de jugo de cítricos" en el año 2016. El objetivo de la investigación fue evaluar la composición fitoquímica y las actividades antioxidantes y antimicrobianas de diferentes concentrados de jugo de cítricos comúnmente disponibles en Nigeria. Según la metodología los frutos de uva, mandarina, limón y lima fueron cortados y extraídos con un extractor de jugo. La actividad antioxidante fue evaluada mediante el ensayo de DPPH y la actividad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en agar con pozos contra cinco bacterias (*Staphylococcus Aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*,

*Escherichia Coli* y *Salmonella* spp.) y tres hongos (*Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Penicillium* spp. Como resultados la composición fitoquímica de los concentrados de jugo de cítricos reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenoides, saponinas, glucósidos cardíacos y azúcares reductores. En las concentraciones estudiadas, el ácido ascórbico tiene una inhibición significativamente mayor del radical DPPH en comparación con los concentrados de jugo. Las cepas Gram positivas mostraron valores de susceptibilidad más altos que las cepas Gram negativas. *Staphylococcus Aureus* registró zonas de inhibición de entre 10 y 20 mm. *Enterococcus faecalis* tenía zonas de inhibición de 8 mm. Los investigadores concluyen que los zumos de las frutas de uva, mandarina, limón y lima presentan actividad antioxidante y antibacteriana contra las cepas Gram positivas<sup>15</sup>.

Muñoz M y Gutierrez M en el 2016 realizaron la investigación titulada: “Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana Glauca*”. La investigación tiene como objetivo determinar la actividad antioxidante de 4 partes del árbol *Nicotiana Glauca*. Según su metodología, se prepararon los extractos metanólicos mediante maceración exhaustiva durante una semana, de la misma manera se prepararon los extractos alcaloideos siguiendo las técnicas convencionales. La evaluación de la actividad antioxidante se realizó siguiendo los protocolos del radical DPPH. Como resultados los rendimientos de extracto fueron de 0.418; 0.7817; 0.628; 0.318; 0.462; 1.2094 y 1.619% (p/p), para semilla, tronco, flor, tallo, raíz, hoja y corteza. Respectivamente, además la actividad antioxidante fue mayor para las flores y mejor para la semilla. En conclusión, la actividad antioxidante preliminar de raíz, tallo, flor y semilla es dependiente de la concentración del extracto, además el extracto de flor presentó la mejor actividad antioxidante<sup>16</sup>.

Guerra y colaboradores en el año 2014, en la Universidad del Zulia de Venezuela, realizaron el estudio denominado “Actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus Sinensis*) var. Valencia frente a microorganismos gram positivos y gram negativos”. El objetivo de la investigación fue determinar actividad antibacteriana del aceite esencial de cascara de naranja frente a *Escherichia Coli* y *Pseudomona aeruginosa* (Gram negativos) y *Staphylococcus Aureus*, *Listeria monocytogenes* (Gram positivos). Según su metodología el aceite esencial se obtuvo mediante un sistema de hidrodestilación a partir de las cortezas de naranjas cultivadas en el municipio Bejuma, estado Carabobo, Venezuela. Se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana por difusión en

discos de Bauer–Kirby a concentraciones del aceite esencial a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%, diluidas en etanol absoluto. Como resultados las bacterias *E. Coli* y *P. aeruginosa* presentaron una concentración mínima inhibitoria (CIM) de 10 y 9%, más no resultó sensible frente a bacterias Gram positivas. Los investigadores concluyen que el aceite esencial de naranja presenta elevada actividad antibacteriana contra *E. coli*, y moderada actividad contra *P. aeruginosa*<sup>17</sup>.

## 2.2. Bases teóricas

### 2.2.1. Clasificación taxonómica *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late*.

La clasificación fue realizada por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, se tomó en cuenta el sistema de clasificación de Cronquist (1988), la especie vegetal *Citrus sinensis* L. tiene la siguiente posición taxonómica tal como indica la Constancia de Clasificación (ANEXO1), La identificación fue realizada por el biólogo Mg. Asunción Cano Echevaria jefe del Herbario de la UNMSM (C.B.P. N° 5739)

**DIVISIÓN** : MAGNOLIOPHYTA

**CLASE** : MAGNOLIOPSIDA

**SUBCLASE** : ROSIDAE

**ORDEN** : SAPINDALES

**FAMILIA** : RUTACEAE

**GENERO** : *Citrus*

**ESPECIE** : *Citrus sinensis* Linn Osbeck





**Figura 1.** Fruto de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* .

### **2.2.2. Descripción botánica de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.**

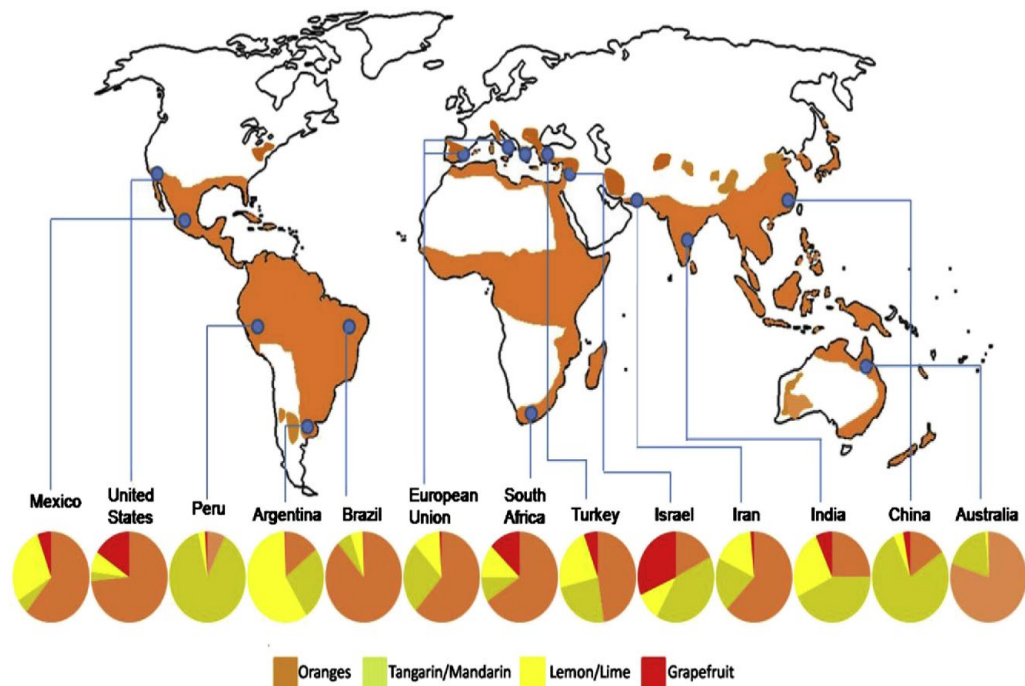
La naranja *Citrus sinensis* Linn Osbeck (variedad *Valencia late*) es uno de los cultivos más importantes del mundo; Se utiliza principalmente para la extracción y consumo de su jugo fresco. Además, debido a los compuestos químicos presentes en sus subproductos y desechos, la naranja de esta variedad ha sido objeto de investigaciones en busca de posibles aplicaciones, como aditivos alimentarios, antioxidantes, antimicóticos y antibacterianos naturales. Además, debido a su relevancia global, se han desarrollado muchas especies diferentes que dan como resultado frutos con diferentes características taxonómicas, morfológicas y de composición. La naranja (*C. sinensis* variedad *Valencia Late*) pertenece a la familia Rutaceae que contiene alrededor de 1700 especies; la mayoría de éstas especies se pueden encontrar en África<sup>18</sup>.

Es un árbol híbrido originario de India, Vietnam y el sudeste asiático, es de tamaño mediano (7-10 m), contiene semillas y con corona ancha, posee hojas brillantes y flores blancas bisexuales, el fruto es redondo de aproximadamente 6-10 cm de diámetro con una cáscara ligeramente rugosa, el fruto surge a través del crecimiento y desarrollo de un ovario que consiste en 8–16 carpelos agrupados y unidos al eje floral, que forma el núcleo de la fruta. Los carpelos forman lóculos, o segmentos, en los que crecen las semillas y los sacos de jugo (vesículas). El pericarpio (corteza o cáscara) se divide en exocarpio o flavedo, y mesocarpio o albedo. El flavedo consiste en las capas de tejido más externas, que tienen una epidermis y células de parénquima cubiertas de cutículas. El flavedo es la parte externa de color y el albedo es el interno, incoloro (blanco) o, a veces con partes teñidas comúnmente denominadas naranjas de sangre<sup>19-20</sup>.

### **2.2.3. Distribución geográfica de *Citrus sinensis***

Se cree que las diversas especies del género *Citrus* se originan en las regiones tropicales y subtropicales del sudeste asiático. La primera especie de cítricos conocida por la

civilización europea fue la cidra, como lo menciona alrededor del año 310 AC. Muchos siglos después, el resto de las especies de cítricos se conocieron en Occidente. Los exploradores portugueses introdujeron las naranjas al sur de Europa siguiendo los pasos de la expedición de Vasco. La naranja se extendió de China a la costa este de África y luego a Europa, poco después de que comenzara la era cristiana, presumiblemente en Italia. A principios del siglo XVI, la naranja estaba bien establecida y tenía una gran importancia comercial en el sur de Europa. Las rutas comerciales árabes, la expansión alrededor del mar Mediterráneo y las cruzadas fueron los eventos clave que más contribuyeron a la expansión de la naranja en estas áreas. En Estados Unidos, las naranjas se introdujeron a mediados del siglo XVI después de ser muy valoradas por los europeos. En América, los misioneros difundieron el cultivo de naranja, y en la actualidad se estima que es mayoritaria en los países de Brasil, Estados Unidos y México.



**Figura 2.** Distribución geográfica de la producción de los principales cítricos durante los años 2007–2016.

#### 2.2.4. Usos de *Citrus sinensis* variedad Valencia Late



El cítrico es un cultivo importante con una producción mundial estimada en 115 millones de toneladas por año. Las naranjas, limones, toronjas y mandarinas representan aproximadamente el 98% de los cultivares industriales<sup>21</sup>. Los principales usos de los cítricos en las industrias alimentarias incluyen jugos frescos o bebidas a base de cítricos. Además, los cítricos y los jugos son una fuente importante de compuestos bioactivos que incluyen antioxidantes como el ácido ascórbico, los flavonoides y los compuestos fenólicos que son importantes para la nutrición humana<sup>22</sup>.

Aunque los cítricos se usan principalmente para jugos y néctares, tiene un valor económico significativo para su aceite esencial debido a sus compuestos aromáticos. Debido a que el rendimiento de jugo de los cítricos es menos de la mitad del peso de la fruta, se produce una gran cantidad de desechos de subproductos cada año. Se ha propuesto que los subproductos cítricos, principalmente el aceite esencial, podrían ser fuentes de antioxidantes y antimicrobianos naturales<sup>23</sup>.

Esta fruta crea cantidades considerables de desechos o subproductos como cáscaras, semillas y pulpas que representan el 50% de la fruta procesada cruda. Estos subproductos se consideran una fuente valiosa de ingredientes funcionales, como flavonoides, fibras dietéticas y aceites esenciales<sup>24</sup>.

Varios estudios han demostrado las propiedades antibacterianas y antioxidantes de los aceites esenciales de cítricos, e informaron que existe una relación entre los compuestos químicos de los aceites esenciales con estas propiedades. Aunque el uso principal de *C. sinensis* L. es dar sabor a las bebidas, algunos investigadores indican la posibilidad de explotar el aceite esencial de *C. sinensis* como un inhibidor efectivo de los hongos biodegradables y contaminantes del almacenamiento en algunos cultivos<sup>25</sup>.

### **2.2.5. Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son productos vegetales naturales muy interesantes y entre otras cualidades poseen varias propiedades biológicas. El término "biológico" comprende todas las actividades que estas mezclas de compuestos volátiles (principalmente mono y sesquiterpenoides, benzenoides, fenilpropanoides, etc.) ejercen sobre humanos, animales y otras plantas. La complejidad de estos productos naturales, las pruebas toxicológicas o bioquímicas de un aceite esencial siempre sea la suma de sus componentes que actúan de manera sinérgica o antagónica con unos y otros. Por lo

tanto, la caracterización química del aceite esencial es muy importante para la comprensión de sus propiedades biológicas<sup>26</sup>.

### 2.2.5.1. Composición química de los aceites esenciales

La investigación con respecto a los compuestos aromáticos de la fruta de naranja se ha llevado a cabo durante años. Muchos investigadores han estudiado los compuestos volátiles de esta fruta utilizando diversos métodos analíticos. Como resultado de estos estudios, se han descrito más de 200 compuestos como componentes del sabor de la naranja. Los principales compuestos aromáticos encontrados en el jugo de naranja son hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, ésteres y cetonas<sup>27</sup>. Los aceites esenciales de cítricos, que previamente se habían descartado como desechos, son utilizados por la industria alimentaria como agentes saborizantes, antimicrobianos y antioxidantes. Debido a su gran importancia nutracéutica y económica, se han realizado numerosas investigaciones destinadas a identificar la composición química de los aceites esenciales de diferentes especies de cítricos. En el caso de la naranja *C. sinensis* L. la mayoría de los estudios se han realizado con el aceite esencial obtenida de la cáscara de diferentes cultivos. La cáscara de naranja contiene una gran cantidad de sustancias fragantes que se aplican ampliamente para su procesamiento en aceites esenciales que se utilizan comercialmente para aromatizar alimentos, bebidas, perfumes y cosméticos, entre otros. La presencia de terpenos con trazas de componentes oxigenados imparte el aroma característico del aceite esencial de naranja y los aceites esenciales de cáscara. Los componentes volátiles presentes en cáscaras de *C. sinensis* en gran medida terpenos. Los hidrocarburos mono y sesquiterpénicos, junto con varios derivados oxigenados que comprenden alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y epóxidos, también se encuentran como compuestos principales<sup>28</sup>.

En general, los componentes presentes en el aceite esencial de naranja se pueden agrupar en cinco clases: monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados y otros compuestos oxigenados<sup>29</sup>.

El limoneno es el principal compuesto presente con un promedio entre el 71 al 95.1% en el aceite esencial de naranja. Los componentes volátiles se pueden extraer mediante destilación al vapor, hidrodestilación o extracción con fluido supercrítico y se caracterizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas. Se han identificado cincuenta compuestos en el aceite esencial de la cáscara *C. sinensis* L. entre ellos el

limoneno, el  $\alpha$ -pineno y el linalool fueron los más comunes a todos los cultivos, dentro de los cultivos estudiados<sup>29</sup>.

Sin embargo, cultivar no es el único parámetro que afecta la composición química del aceite esencial; depende de varios otros factores, como el medio ambiente, la etapa de maduración del fruto, el período de cosecha y el método de extracción, entre otros. La técnica comercial común para producir aceites esenciales a partir de cáscaras de cítricos se realiza mediante prensado en frío, un proceso que genera aceites que contienen compuestos de furocumarinas, fotomutagénicos y fotocarcinógenos. Como consecuencia, se han estudiado diferentes métodos de extracción como hidrodestilación, destilación por arrastre a vapor de agua, destilación de vapor de microondas, y caída de presión controlada con el objetivo de mejorar la extracción y composición del aceite esencial<sup>30</sup>.

Aunque, los compuestos presentes en el aceite esencial de cáscara de naranja se han estudiado ampliamente, algunos autores informaron que los compuestos presentes en otras partes de la fruta de naranja, por ejemplo, el jugo de naranjas, se identificaron un total de 49 compuestos, con limoneno como componente principal, seguido de linalol, terpinen-4-ol,  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -terpineol, octanal y  $\gamma$ -terpinene. Mientras que el aceite esencial de cáscara de naranja contenía terpenos a niveles más altos que los que se encuentran en el jugo de fruta; el butanoato de etilo, el  $\beta$ -mirceno, el octanal, el linalool y el decanal son responsables del aroma del jugo, mientras que el linalool, el  $\alpha$ -pineno y el decanal son responsables del aroma del aceite esencial de la cáscara<sup>30</sup>.

#### **2.2.5.2 Actividad antibacteriana de los aceites esenciales**

Existe gran variedad de aceites esenciales, siendo los aceites esenciales de cítricos los que han ganado aceptación en la industria alimentaria, ya que generalmente son reconocidos por sus componentes principales como seguros y muchos productos toleran su presencia. Hoy en día, los aceites esenciales de cítricos se aplican industrialmente a muchos productos, incluidos alimentos y bebidas, así como a cosméticos y medicamentos, debido a su amplio espectro de actividades biológicas, como ser agentes antibacterianos y antifúngicos efectivos<sup>31</sup>.

La actividad antibacteriana del aceite esencial de naranja se atribuye principalmente a los terpenos que constituyen la mayor parte de los aceites cítricos. Aunque el limoneno

es el componente principal de este aceite esencial, se ha informado que la actividad antibacteriana del aceite esencial de *C. sinensis* es el resultado de la sinergia entre los componentes presentes y en consecuencia, los efectos antibacterianos de este aceite esencial no son uniformes entre las bacterias porque depende de los compuestos presentes. Se ha probado la actividad antibacteriana de diferentes cultivos de *C. sinensis* L.<sup>32-33</sup>.

Evaluaron seis cultivos diferentes de naranja contra bacterias patógenas transmitidas por los alimentos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* entérica) y descubrieron que los aceites esenciales activos de todos los cultivos eran más efectivos contra bacterias Gram-positivas que Gram-negativas. Se ha informado de la capacidad del aceite esencial de naranja para reemplazar los detergentes comerciales en la superficie de los utensilios de cocina, por lo que es un desinfectante<sup>34</sup>.

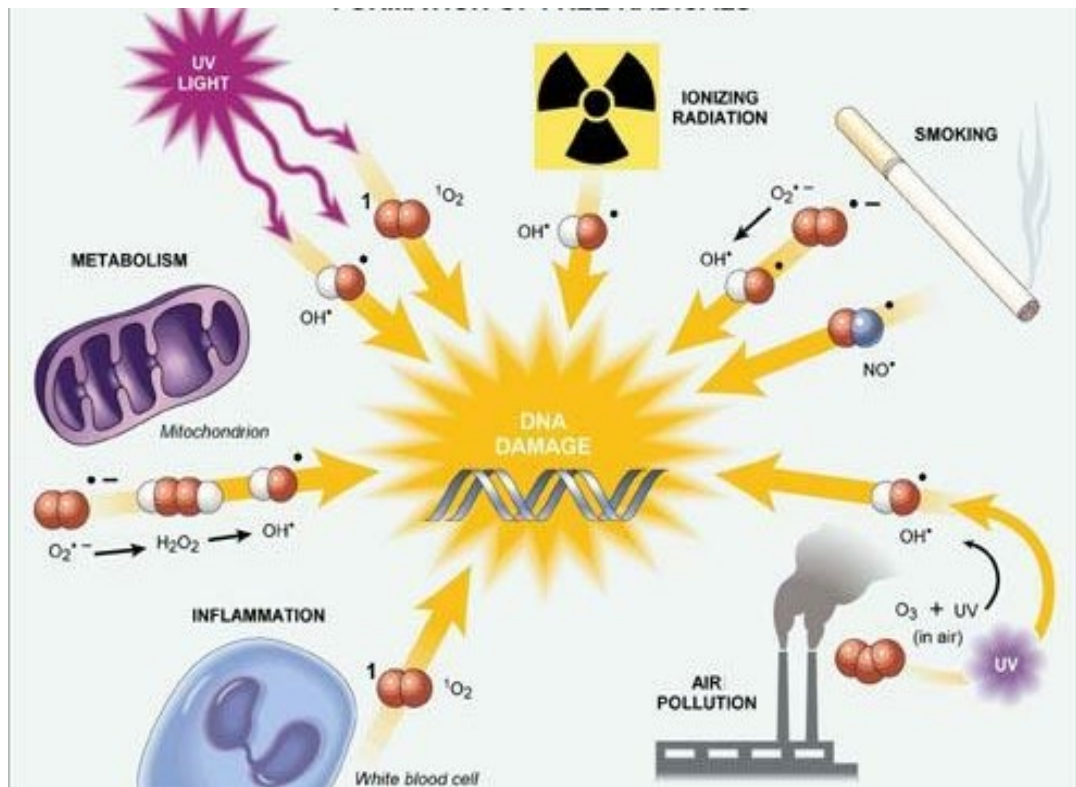
Se ha informado la capacidad del aceite esencial de *C. sinensis* L. para inactivar bacterias Gram negativas como *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* y *Vibrio parahemolyticus* inoculadas en superficies de acero inoxidable y plástico utilizando emulsiones del aceite esencial de naranja; Estas bacterias generalmente sobreviven en las superficies después de lavarlas con detergentes<sup>34</sup>.

Como la presencia de ciertos componentes fitoquímicos y sus interacciones definen la actividad antibacteriana de los aceites esenciales, se ha evaluado la variación de estos compuestos debido a la etapa de maduración de la planta y la capacidad antimicrobiana de su aceite esencial. La actividad antibacteriana del aceite esencial de naranja varió entre las etapas de maduración, comparando el comportamiento de los compuestos presentes en el aceite, el limoneno (el principal monoterpeneo presente) no varió con la etapa de maduración<sup>34</sup>

#### **2.2.6. Antioxidantes y oxidantes**

Se define actividad antioxidante de un compuesto cuando este tiene la capacidad de inhibir la degradación oxidativa, de este modo un antioxidante actúa gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres en cualquier etapa de su proceso de propagación. Es necesario distinguir entre actividad estabilizadora de radicales libres y actividad antioxidante. La primera está determinada por la reactividad de un antioxidante frente a radicales libres, lo cual puede ser caracterizado por la velocidad de

esa reacción. Y la segunda mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa conllevando a una alta actividad de radicales libres, no siempre esta correlaciona con una alta actividad antioxidante; en particular, algunos compuestos fenólicos sintéticos presentan alta reactividad frente a radicales libres, pero muestran moderada actividad antioxidante<sup>35</sup>.



**Figura 3.** Formación de los radicales libres y el daño que produce en el ácido desoxirribonucleico (ADN)

### 2.2.6.1 Métodos para evaluar la actividad antioxidante

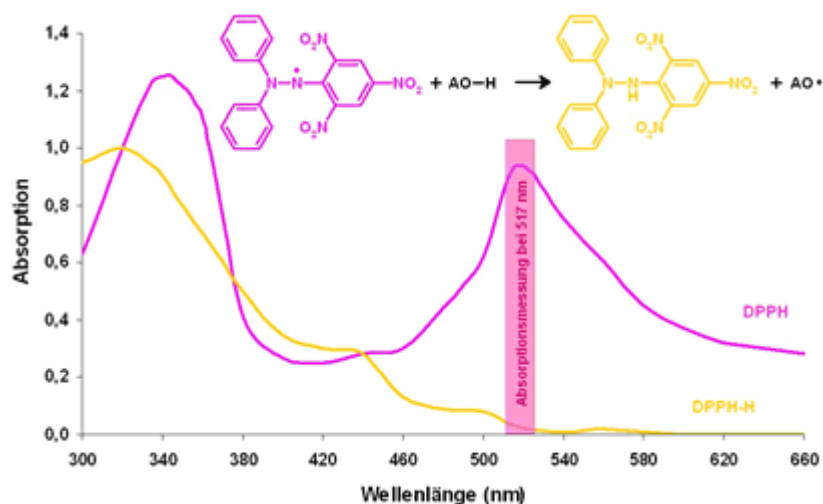
Se utilizan varios métodos para investigar las propiedades antioxidantes y se utilizan en diferentes tipos de muestras (dietas, extractos de plantas, antioxidantes comerciales, etc.). A continuación, se describirá los métodos más utilizados para evaluar la actividad antioxidante<sup>35</sup>.

#### 2.2.6.1.1. Técnicas in vitro

En la práctica diversas pruebas *in vitro* que se llevan a cabo para evaluar las actividades antioxidantes de diversas muestras de interés, usan modelos de prueba y varían en diferentes aspectos, por lo cual es difícil comparar completamente un método con otro. Diversos investigadores tienen que verificar críticamente los métodos de análisis antes de adoptar uno, para su propósito de investigación. Generalmente las pruebas antioxidantes *in vitro* utilizan trampas de radicales libres, que son relativamente sencillas de realizar. Entre los métodos de eliminación de radicales libres, se encuentran el DPPH y el ABTS, estos ensayos son aplicables tanto para los antioxidantes polares como para los apolares. Es importante tener en cuenta que uno puede optimizar el método para servir a su objetivo experimental <sup>36</sup>.

### 2.2.6.1.2. Método del radical DPPH

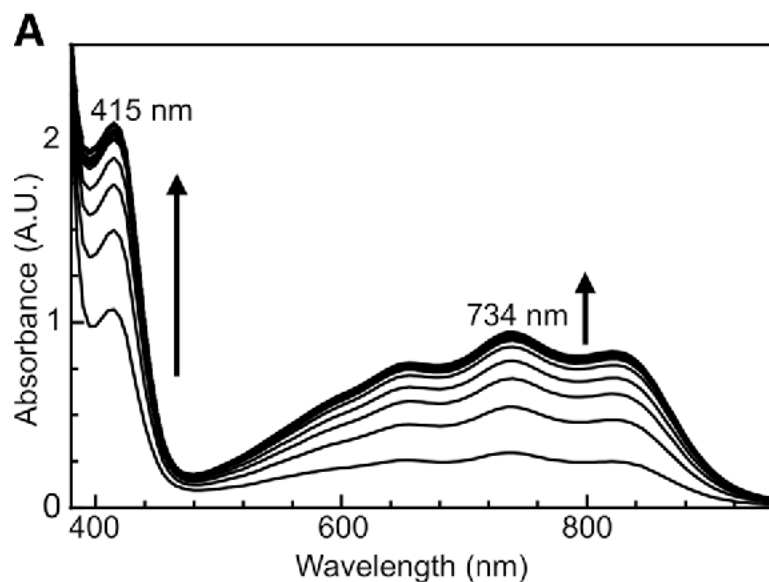
DPPH es una abreviatura común para un compuesto químico orgánico 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl. Es un polvo cristalino de color oscuro compuesto de moléculas estables de radicales libres. DPPH tiene dos aplicaciones principales, ambas en investigación de laboratorio: una es monitorear reacciones químicas que involucran radicales y otra es un estándar de la posición e intensidad de las señales de resonancia paramagnética de electrones. DPPH es un radical bien conocido como una trampa ("carroñero") para otros radicales. Por lo tanto, la reducción de la velocidad de una reacción química tras la adición de DPPH se usa como un indicador de la naturaleza radical de esa reacción. Debido a una fuerte banda de absorción centrada a aproximadamente 525 nm, el radical DPPH tiene un color violeta intenso en solución y se vuelve incoloro o amarillo pálido cuando se neutraliza. Esta propiedad permite el monitoreo visual de la reacción, y el número de radicales iniciales puede contarse a partir del cambio en la absorción óptica a 525 nm o en la señal (EPR) Espectroscopia de Resonancia de Paramagnetismo del DPPH<sup>37</sup>.



**Figura 4.** Curva espectral del radical DPPH en sus estados de oxidación y reducción.

### 2.2.6.3. Método del radical catiónico ABTS

Este método utiliza un espectrofotómetro de matriz de diodos para medir la pérdida de color cuando se agrega un antioxidante al cromóforo azul-verde ABTS® (ácido 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)). El antioxidante reduce ABTS® a ABTS y lo decolora. ABTS® es un radical estable que no se encuentra en el cuerpo humano. La actividad antioxidante se puede medir como se describe por Seeram et al. (2006) Los cationes radicales ABTS se preparan agregando dióxido de manganeso sólido (80 mg) a una solución madre acuosa 5 mM de ABTS (20 ml usando un tampón Na / K 75 mM de pH 7). Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), un análogo soluble en agua de la vitamina E, puede usarse como un estándar antioxidante. Se construye una curva de calibración estándar para Trolox a concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 350  $\mu$ M. Las muestras se diluyen adecuadamente de acuerdo con la actividad antioxidante en Na / K buffer pH, 7. Las muestras diluidas se mezclan con 200  $\mu$ l de solución de catión radical ABTS + en placas de 96 pocillos, y se lee la absorbancia (a 750 nm) después de 5 minutos en un lector de microplacas. Los valores de TEAC pueden calcularse a partir de la curva estándar de Trolox y expresarse como equivalentes de Trolox (en mM)<sup>38</sup>.





**Figura 5.** Curva espectral de diversas concentraciones del radical catiónico ABTS en sus estados oxidados.

#### **2.2.6.4. Ensayo de poder reductor antioxidante férrico (FRAP)**

Este método mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el hierro férrico. Se basa en la reducción del complejo de hierro férrico y cloruro de 2,3,5-trifenil-1,3,4-triazina-2-azoniaciclopenta-1,4-dieno (TPTZ) a la forma ferrosa a pH ácido. Esta reducción se controla midiendo el cambio en la absorción a 593 nm, usando un espectrofotómetro de matriz de diodos. El ensayo antioxidante puede realizarse mediante el método desarrollado por Benzie y Strain (1999). Se mezclan tres mililitros de reactivo FRAP preparado con muestra diluida; la absorbancia es medida a 593 nm, se registra después de una incubación de 30 minutos a 37 ° C.

Los valores FRAP se pueden obtener comparando el cambio de absorción en la mezcla de prueba con los obtenidos de concentraciones crecientes de  $Fe^{3+}$  y expresados como mM de equivalentes de  $Fe^{2+}$  por kg (alimento sólido) o por L (bebidas) de muestra<sup>39</sup>.

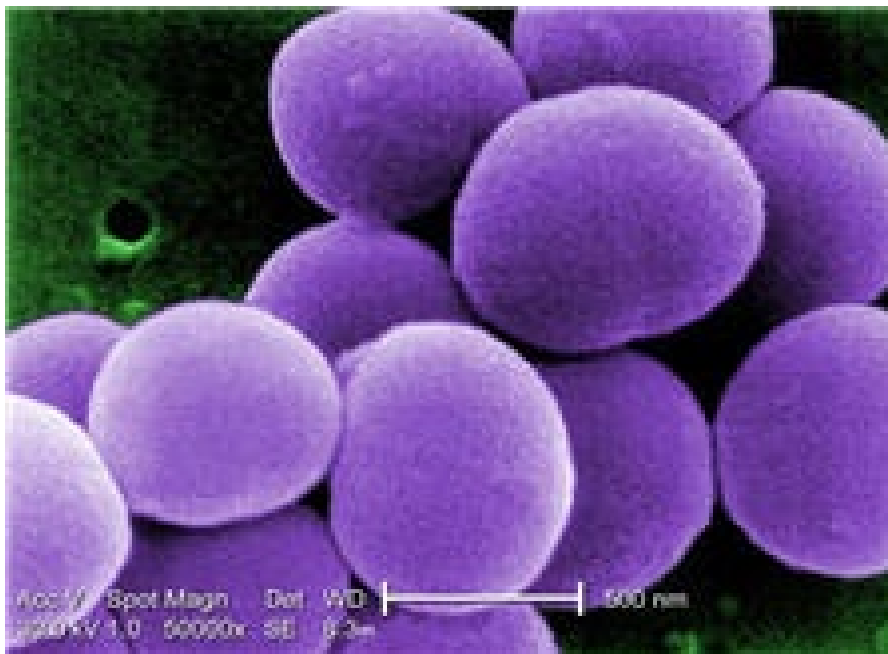
#### **2.2.6.5. Método de parámetro antioxidante de captura de radicales totales (TRAP)**

Este método se basa en la protección proporcionada por los antioxidantes en la descomposición de fluorescencia de R-ficoeritrina (R-PE) durante una reacción de peroxidación controlada. La fluorescencia de la R-Ficoeritrina se apaga mediante ABAP (hidrocloruro de 2,20-azo-bis (2-amidino-propano)) como generador de radicales. Esta reacción de enfriamiento se mide en presencia de antioxidantes. El potencial antioxidante se evalúa midiendo la descomposición en decoloración. De acuerdo con Ghiselli et al. (1995) se añaden 120 uL de muestra diluida a 2,4 ml de tampón fosfato (pH 7,4), 375 uL de agua bidestilada, 30 uL de R-PE diluido y 75 uL de ABAP; La cinética de reacción es a una temperatura de 38 ° C se registra durante 45 minutos mediante un espectrómetro de luminiscencia. Los valores de TRAP se calculan a partir de la duración de la fase de retraso debido a la muestra en comparación con el estándar<sup>40</sup>.



### 2.2.7. *Staphylococcus aureus*

Son células esféricas, con un diámetro de 0,5 – 1,5  $\mu\text{m}$ . mediante la tinción de Gram se encuentran aisladas en pares o formando racimos y son gram positivos. Si proviene de un cultivo en agar nutritivo, los cocos se agrupan en forma de racimos de uvas. No forman esporas, no tienen flagelos, pueden ser aerobios o anaerobios facultativos. Fermentan carbohidratos y producen pigmentos de color blanco, amarillo o dorado y algunas cepas presentan una capa de polisacáridos extracelulares que también se asocian con enfermedades humanas. Algunos son miembros de la flora normal de la piel y mucosas en los seres humanos, a veces causan infecciones piógenas e incluso septicemia que puede llegar a ser mortales. Casi toda persona presenta algún tipo de infección por *Staphylococcus aureus* durante su vida, que varía en gravedad desde intoxicaciones alimentarias o infecciones cutáneas menores hasta infecciones graves potencialmente mortales. Los *Staphylococcus coagulasa* negativos a veces causan infección en el aparato digestivo ya que los alimentos contaminados contienen toxinas produciendo intoxicación alimentaria en pocas horas. Estos patógenos casi siempre causan hemólisis, coagulación del plasma y producen varias enzimas y toxinas extracelulares<sup>41</sup>.



**Figura 6.** Imagen de la bacteria *Staphylococcus aureus* por microscopía electrónica

### 2.2.8. *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram (-), de la familia *Enterobacteriaceae*, aerobio y anaerobio facultativo que posee forma de barra, mide aproximadamente de 1-3  $\mu\text{m}$  por 0,5  $\mu\text{m}$  por flagelos, se presentan solos, en pares, en cadenas cortas o formando grupos. En general son móviles, aunque existen variantes inmóviles no flageladas, no forma esporas y por lo general es no capsulado. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, es inactivado a 60°C, pero posee propiedades de desarrollo en una gama bastante amplia de temperaturas; el pH es 7. Es capaz de fermentar glucosa, lactosa y un gran número de carbohidratos con producción de ácido y gas, en agar forma colonias circulares de 3 a 5 mm convexas, de borde continuo o un tanto ondulado, brillantes y de coloración blanca un poco amarillenta, produce sulfuro de hidrogeno en determinados medios, acidifica y coagula la leche<sup>42</sup>.

Las cepas toxigénicas de *Escherichia coli* pueden producir una enterotoxina termolábil (TL), una termoestable (TS) o ambas. La termolábil es una proteína de alto peso molecular, que bioquímicamente es muy similar a la toxina de *Vibrio cholerae*, altamente tóxica. Existen a los menos cinco grupos diferentes de *Escherichia coli* que pueden producir gastroenteritis, presenta 5 clonas las cuales son:

- *Escherichia coli* enteropatógeno que afecta la mucosa intestinal.
- *Escherichia coli* enteroinvasiva que afecta a la mucosa del colón.
- *Escherichia coli* enterohemorrágica que produce una colitis hemorrágica.
- *Escherichia coli* enteroagregativa que se caracteriza por diarrea secretora de moco y sangre.
- *Escherichia coli* enterotoxigénica por muy común en los países de desarrollo<sup>42</sup>.



**Figura 7.** Imagen de *Escherichia coli* por microscopia electrónica

## **2.2.9. Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana**

### **2.2.9.1. Método de difusión en disco agar**

Las pruebas de difusión en disco de agar desarrolladas en 1940, es un método oficial usado en muchos laboratorios clínicos de microbiología para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos de rutina. Hoy en día, el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI siglas en inglés) publica muchas normas aceptadas y aprobadas para pruebas de bacterias y levaduras a nivel internacional. Aunque no todas las bacterias se pueden analizar con precisión mediante este método, la estandarización se ha realizado para evaluar ciertos patógenos bacterianos como enterobacterias, (utilizando medios de cultivo específicos) diversas condiciones de incubación y criterios interpretativos para zonas de inhibición. En este procedimiento, las placas de agar se inoculan con un inóculo estandarizado del microorganismo de prueba. Luego, los discos de papel de filtro (de aproximadamente 6 mm de diámetro), que contienen el compuesto de prueba a una concentración deseada, se colocan en la superficie del agar. Las placas de Petri se incuban en condiciones adecuadas. Generalmente, el agente antimicrobiano se difunde en el agar e inhibe el crecimiento del microorganismo de prueba y luego se miden los diámetros de las zonas de crecimiento de inhibición a las 24 horas<sup>43</sup>.

### **2.2.9.2. Método de gradiente antimicrobiano (Etest)**

El método de gradiente antimicrobiano combina el principio de los métodos de dilución con el de los métodos de difusión para determinar el valor de Concentración Media Inhibitoria (CMI). Se basa en la posibilidad de crear un gradiente de concentración del agente antimicrobiano probado en el medio de agar. El Etest es una versión comercial de esta técnica. En el procedimiento, una tira impregnada con un gradiente de concentración creciente del agente antimicrobiano. De un extremo al otro se deposita en la superficie del agar, previamente inoculada con el microorganismo probado. Este método se utiliza para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de antibióticos, antifúngicos. El valor de CMI se determina en la intersección de la tira y la elipse de inhibición del crecimiento. Es simple de implementar; por lo tanto, se usa habitualmente para satisfacer la demanda de los médicos<sup>44</sup>.

### 2.2.9.3. Método de difusión del tapón de agar

El método de difusión del tapón de agar se usa a menudo para resaltar el antagonismo entre microorganismos, y el procedimiento es similar al utilizado en el método de difusión en disco. Implica hacer un cultivo de agar de la cepa de interés en su medio de cultivo apropiado mediante rayas apretadas en la superficie de la placa. Durante su crecimiento, las células microbianas secretan moléculas que se difunden en el medio de agar. Después de la incubación, se corta asépticamente un diagrama de agar o cilindro con un taladro de corcho estéril y se deposita en la superficie de agar de otra placa previamente inoculada por el microorganismo de prueba. Las sustancias se difunden desde el tapón al medio de agar. Luego, la actividad antimicrobiana de las moléculas microbianas secretadas se detecta por la aparición de la zona de inhibición alrededor del tapón de agar<sup>45</sup>.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Tipos de investigación:

Según:

- Estrategia utilizada: Cuasi experimental
- Tendencia o enfoque: Investigación Cuantitativa

**Cuasi Experimental:** La investigación cuasi-experimental se asemeja a la experimental en el hecho de que se pretende manipular una o varias variables concretas, con la diferencia de que no se posee un control total sobre todas las variables, como por ejemplo aspectos vinculados al tipo de muestra que se presenta al experimento

**Cuantitativa:** El procedimiento cuantifica los datos y en general aplica análisis estadístico para señalar una relación con las variables<sup>50</sup>

#### 3.2. Población y muestra

##### 3.2.1. Población

La población de estudio está conformada por los Frutos de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.

##### 3.2.2. Muestra

Muestra biológica: 6,100g de cáscaras de naranjas aprox. *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* recolectadas de las vendedoras de jugo del mercado de Barranca.

Para la determinación del tamaño de los grupos para el análisis antibacteriano se utilizó la siguiente ecuación, cuyo objetivo es la comparación de promedios:

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

Dónde:

$Z_{\alpha} = 1.96$  Valor de la distribución Normal correspondiente a un error tipo I del 5%

$Z_{\beta} = 1.04$  Valor de la distribución Normal correspondiente a una potencia de prueba del 85%

$S = 0,33$  mm, Es la desviación estándar estimada obtenida de Ochoa k, et al (2015)

$d = 0,50$  mm es la diferencia entre tratamientos que queremos detectar.

Reemplazando tenemos:

$$n = \frac{2(1.96 + 1.04)^2 0,33^2}{0,50^2} = 7,8 = 8$$

De este modo el tamaño mínimo para realizar las comparaciones múltiples con un nivel de significancia del 5% es de 8 discos por cada grupo.

### 3.3. Materiales, solventes y reactivos

#### 3.3.1. Material Biológico o especie vegetal

Cascaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late*.

#### 3.3.2. Material microbiológico

- Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922
- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

#### 3.3.3. Material químico

##### 3.3.3.1. Solventes químicos:

Agua destilada, metanol Q.P. Merck, etanol 96° Alkofarma, cloroformo Q.P. Merck, dimetilsulfoxido Q.P. , éter etílico Q.P. Merck.

##### 3.3.3.2. Reactivos químicos:

Sulfato de sodio anhidro, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).

#### 3.3.4. Materiales de vidrio

- Beacker de 250mL.

- Balón de 6 L.
- Refrigerante.
- Embudo de decantación de 250 mL.
- Tubos de ensayos.
- Cubetas para espectrofotómetro.
- Embudo de vidrio.
- Pipeta de 5 mL.

### 3.3.5. Equipos

- Balanza analítica de 6 dígitos AND.
- Estufa de marca Memmert.
- Cámara de incubación.
- Cámara estéril.
- Espectrofotómetro UV/VIS Génesis 10
- Cocinilla eléctrica.

## 3.4. Métodos

### 3.4.1. Lugar de ejecución

La investigación se desarrolló en el Centro de Investigación Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Norbert Wiener en el periodo de Junio a Setiembre del 2019.

### 3.4.2. Estudio cualitativo de la especie *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late*.

#### 3.4.2.1. Recolección del material botánico

La especie vegetal de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late*, fue recolectada en el Departamento de Lima provincia de Barranca. Se necesitaron 6100 g aproximadamente de cáscaras frescas de naranja previamente limpiadas con agua para eliminar rastros de tierra u otro contaminante.

#### 3.4.2.2. Obtención del aceite esencial

De seis kilos de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* ,se realizaron 3 extracciones (2kg.de cáscaras) mediante un sistema de destilación por arrastre a vapor de agua. El aceite esencial obtenido se separó bajo los principios de miscibilidad

mediante el uso de un embudo de decantación, la muestra se deshidrata usando sulfato de sodio anhidro. La muestra se pasó por un filtro de 25  $\mu\text{m}$  y se conservó en un frasco ámbar en refrigeración a 4°C<sup>46</sup>.

### 3.4.3. Ensayos preliminares

#### 3.4.3.1. Prueba de miscibilidad del aceite esencial y tamizaje fitoquímico

La prueba de miscibilidad se realizó agregando 0,1 mL del aceite esencial en cada tubo de ensayo frente a 0,9 mL de solventes tales como: metanol, etanol, n-butanol, dimetilsulfoxido, propilenglicol, éter etílico y cloroformo<sup>46</sup>.

Para evaluar los **metabolitos secundarios** se tuvo que pesar entre 30-50 gramos de cáscara trozada finamente. La muestra se coloca en un vaso de precipitación y se adicionan 150 mL de éter etílico dejándose reposar por 48 horas, cumplido el tiempo se procede a filtrar, el éter filtrado sería el extracto para realizar los ensayos de:

**Ensayo de sudan:** A una alícuota del extracto se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente. La presencia de compuesto grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo.

**Ensayo de dragendorff:** Se toma una alícuota del extracto disuelto en un solvente orgánico, debe evaporarse en baño de agua y al residuo se le adiciona 1 mL de ácido clorhídrico al 1%. Con la solución acuosa acida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de dragendorff, si hay opalescencia, turbidez definida o precipitado, se considera positivo el ensayo.

**Ensayo de Mayer:** Se procede de forma similar a la anterior, se añade una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agita y filtra. Luego añadir 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer. Si se observa opalescencia, turbidez definida o precipitado coposo, se considera positiva la reacción.

**Ensayo de Wagner:** Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución acida, añadiendo 2 o 3 gotas del reactivo, se considera positiva la reacción si se observa opalescencia, turbidez definida o precipitado coposo.

**Ensayo de lieberman-burchard:** El extracto debe redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y de 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración: Rosado-azul muy rápido o Verde intenso u oscuro.



La fracción no soluble de la extracción etérea, se solubilizó en una solución hidroalcohólica de 150 mL en la proporción de 3:7 (agua: etanol). Se dejó reposar por 48 horas, cumplido el tiempo se procedió a filtrar y se realizaron los siguientes ensayos:

**Ensayo de Shinoda:** Se adiciona 1 mL de extracto reconstituido en agua, HCl concentrado, 0,5gr de Mg -1 mL de alcohol amílico (agitar y dejar reposar). La formación de precipitado y coloración roja intensa indica la presencia de flavonoides.

**Ensayo de Fehling:** Se colocó en un tubo de ensayo 1 mL de muestra y se agregó 1mL de Fehling A y 1 mL de Fehling B, luego se calentó en baño maría por 2 min.

**Ensayo Afrosimétrico:** Se adiciona en un tubo de ensayo 0.5 gr de extracto con 4 mL de agua destilada. La presencia de saponinas se mide con 1 mL de espuma persistente en el tubo de ensayo.

**Ensayo de Tricloruro férrico:** El extracto se reconstituye en solución acuosa y se adiciona 2 ml de solución de tricloruro férrico al 10%. La azul verdosa indicaría la presencia de compuesto fenólicos.

#### **3.4.3.2. Determinación de la densidad del aceite esencial de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.**

Se determinó la densidad relativa por picnometría, los ensayos se realizaron por triplicado según las técnicas estandarizadas de la Official Methods of Analysis (AOAC) Internacional (2016)<sup>46</sup>.

#### **3.4.4. Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH**

Se usó la técnica del radical DPPH, esta técnica fue desarrollada por Brand Williams y modificada por Suarez. El radical DPPH tienen una absorción máxima a una longitud de 517 nm, cuando la solución de radical libre es enfrentada a moléculas antioxidantes existe un fenómeno de óxido-reducción, disminuyendo la absorbancia del radical. La solución DPPH se preparó en metanol a una concentración de  $6 \times 10^{-5}$  M), la proporción para el análisis fue de 800 uL del radical con 400 uL del aceite esencial en 4 concentraciones de 2,5; 5; 10; 20 v/v. Las muestras se dejaron en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Minutos antes de cumplir el tiempo se prepara el blanco de muestra que consta de 800 uL de metanol y 400 uL de etanol. El ensayo se realizó por triplicado y se utilizó la siguiente fórmula para calcular el % de Inhibición del aceite esencial<sup>47</sup>.

Dónde:

$$\%Inhibicion = (Abs.DPPH - Abs. Muestra) Abs. DPPH \times 100$$

%inhibición = Relación existente entre el radical y las moléculas antioxidantes.

Abs DPPH = Lectura de las muestras de control, constituidas por 800 uL de radical y 400 uL del solvente del aceite esencial (sirve para eliminar la posible interacción del solvente con la solución radicalaria)

Abs muestra = Lectura de cada dilución del aceite esencial.

El estándar Trolox se trabajó siguiendo las mismas condiciones a concentraciones de 1,25; 2,5; 5; 10 ug/mL.

### **3.4.5. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*<sup>47</sup>.**

El efecto antibacteriano se desarrolló mediante el método de agar en difusión adaptado por Rojas y col. Esta prueba consiste en la inhibición del crecimiento antibacteriano, mediante la difusión de sustancias líquidas con características antibacterianas sobre un medio sólido (agar), evidenciándose posteriormente la formación de halos claros.

#### **3.4.5.1. Microorganismos evaluados:**

Las cepas fueron reconstituidas y proporcionadas por la Universidad Peruana Cayetano Heredia cumpliendo con el protocolo de reactivación.

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Se utilizó 27 mL del agar Mueller Hinton, mezclado en condiciones asépticas con un 1 mL de la reconstitución bacteriana en las placas petri de 90 mm de diámetro. Se deja solidificar y se etiquetara con el nombre del microorganismo y número de ensayo. Posteriormente se realizó pozos con la ayuda de un tapón horador de aproximadamente 11,5 mm de diámetro.

#### **3.4.5.2. Preparación de inóculos:**

Las soluciones bacterianas se suspendieron en solución salina estéril ajustado a 0,5 de la escala de McFarland para *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Preparación de muestra (*aceite esencial de Citrus sinensis variedad Valencia Late (naranja: Aceite esencial de las cascarras de Citrus sinensis variedad Valencia Late (naranja)*) se diluyó en dimetilsulfoxido a concentraciones de 70; 50 y 30% (V/V). El control positivo utilizado fue sulfadiazina de plata al 1%, y para el control negativo el solvente dimetilsulfoxido<sup>47</sup>.

#### **3.4.6. Pruebas del análisis estadístico**

Los resultados numéricos fueron digitalizados en una base de datos en Excel 2019 luego analizados por el programa Statistical Package for the Social Sciences “SPSS” versión 24.0 En la parte descriptiva se determinaron los valores promedios y desviación estándar. Para probar el efecto antibacteriano se utilizó prueba no paramétrica de Kruskal Wallis debido a que las dispersiones observadas en los grupos no fueron homogéneas. También se realizaron comparaciones múltiples usando la técnica de Games Howell. Respecto a la actividad antioxidante en el aceite esencial de *Citrus sinensis* variedad Valencia Late se determinó el IC50 mediante un ajuste de regresión lineal. Los resultados fueron ilustrados mediante diagramas de barras y gráficos de cajas.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Rendimiento para la obtención del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.

**Tabla 1.** Rendimiento del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.

Muestra	Cantidad de cáscara fresca (Kg)	Cantidad de aceite esencial (mL)	Rendimiento (%) v/p (mL/100g)
Cáscaras de <i>Citrus Sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i> .	6	68.4	1,14

### 4.2. Prueba de miscibilidad del aceite esencial de cáscaras *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.

**Tabla 2.** Prueba de miscibilidad del aceite esencial de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late*.

Solvente	Miscibilidad
Agua	-
Metanol	+
n-butanol	+
Dimetilsulfóxido (DMSO)	++
Éter etílico	++
Cloroformo	++
Etanol	++

Leyenda: (++) totalmente miscible; (+) parcialmente miscible; (-) totalmente inmiscible.

Fuente: Elaboración propia

#### 4.3. Determinación de la densidad relativa y metabolitos secundarios de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.

**Tabla 3.** Densidad relativa del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* determinado por picnometría.

Densidad relativa	Promedio y DS
0,868	0,864 ± 0,0046
0,865	
0,859	

**Tabla 4.** Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo e hidroalcohólica de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late*

	Ensayo	Metabolito	Escala o calificación
Fracción etérea	Lieberman- Buchar	Triterpenos / esteroides	+++
	Sudan	Triglicéridos	-
	Dragendorff	Alcaloides	++
	Mayer	Alcaloides	++
	Wagner	Alcaloides	++
Fracción hidroalcohólica	Shinoda	Flavonoides	+++
	Fehling	Azucares reductores	++
	Afrosimetrico	Saponinas	+
	Tricloruro Férrico	Polifenoles	++

**Leyenda:** Abundante evidencia (+++); Moderada evidencia (++); Poca evidencia (+) y No evidencia (-).

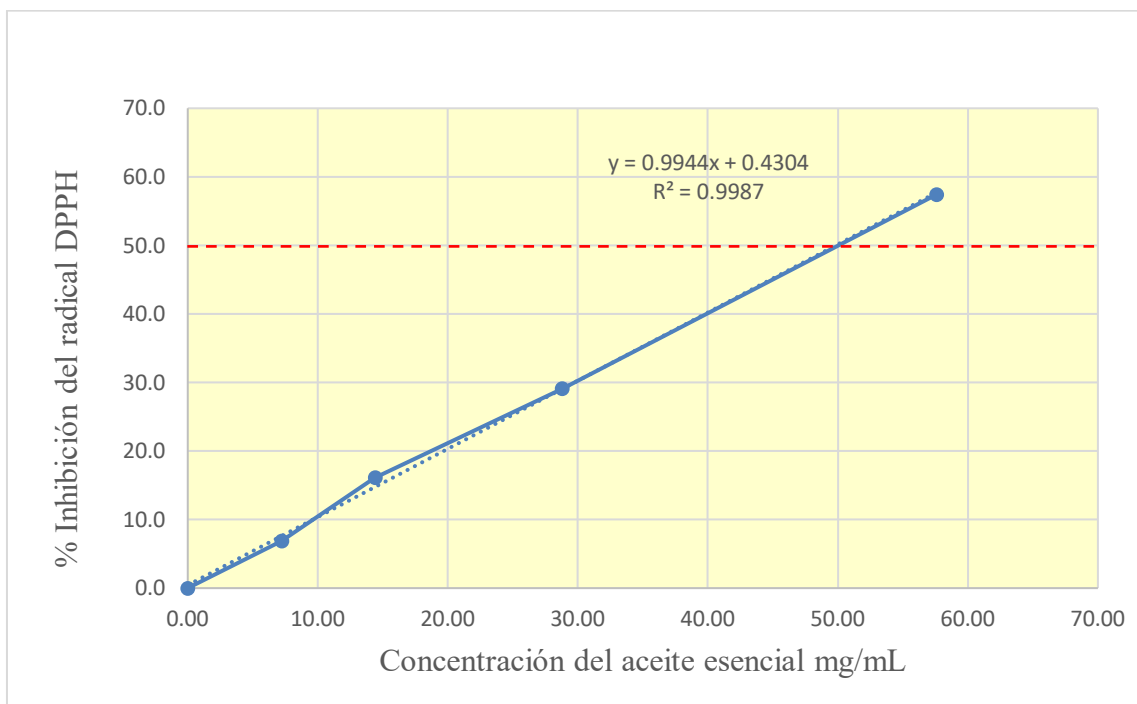
**Fuente:** Elaboración propia

#### 4.4. Comprobación de la actividad antioxidante del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.

**Tabla 5.** Actividad antioxidante del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* mediante el ensayo de DPPH.

Concentración del aceite esencial % (v/v)	Conversión (mg/mL)	Absorbancia	% Inhibición	IC50 mg/ml
0,00	0,00	0,43	0,00	
0,83	7,20	0,40	6,89	
1,67	14,40	0,36	16,12	49,87
3,33	28,80	0,30	29,11	
6,67	57,60	0,18	57,43	

La tabla 5 indica que para conseguir una inhibición del 50% se necesita una concentración de 49,87 mg/mL del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.

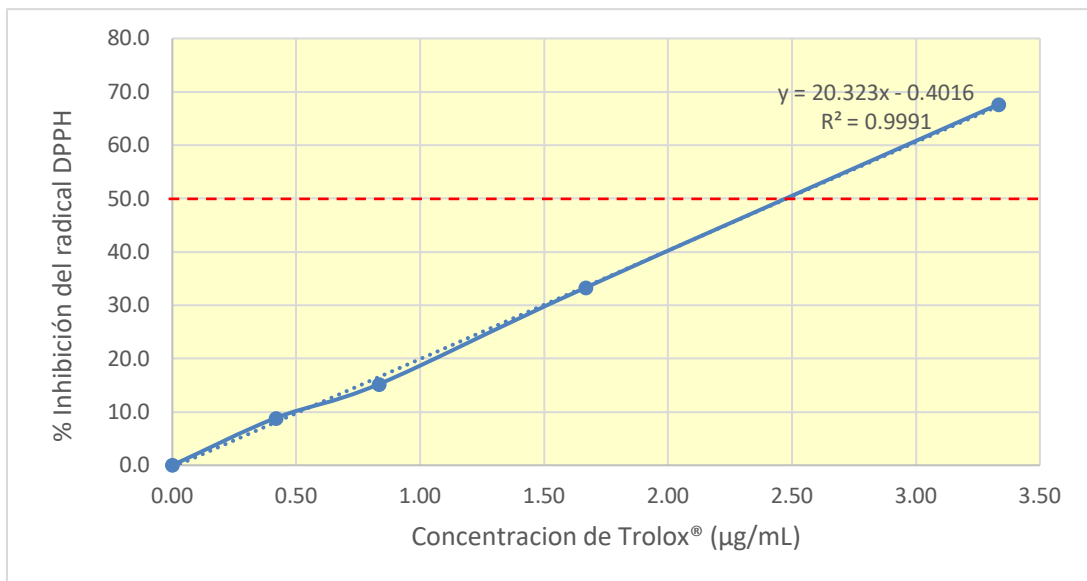


**Figura 8.** Gráfica de dispersión del % inhibición del radical DPPH vs las concentraciones del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*.

**Tabla 6.** Actividad antioxidante del estándar Trolox<sup>®</sup> mediante el ensayo de DPPH

Concentración del Estándar (µg/mL)	Absorbancia	Inhibición (%) DPPH	IC 50 (µg/mL)
0,00	0,48	0,00	
0,42	0,44	8,85	
0,83	0,41	15,21	2,48
1,67	0,32	33,28	
3,33	0,16	67,67	

La tabla 6 indica que para conseguir una inhibición del 50% del radical DPPH se necesita una concentración del estándar Trolox<sup>®</sup> de solo 2,48 µg /mL.



**Figura 9.** Gráfica de dispersión del % inhibición del radical DPPH vs las concentraciones del estándar Trolox.

#### 4.5 Efecto Antibacteriano frente a la cepa de *Staphylococcus aureus*.

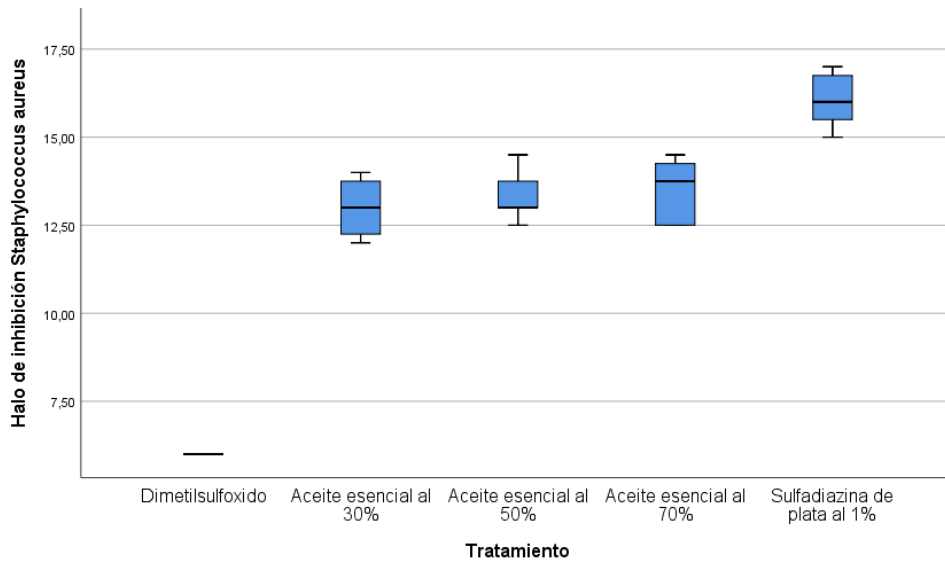
**Tabla 7:** Estadísticas descriptivas del diámetro de halo de inhibición sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

Tratamiento	n	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Porcentaje de efecto Inhibitorio relativo	Prueba de homogeneidad de varianzas
Dimetilsulfóxido	8	6,00	0,00	6,0	6,0	---	
Aceite esencial al 30%	8	13,00	0,80	12,0	14,0	80,9	
Aceite esencial al 50%	8	13,31	0,65	12,5	14,5	82,9	0,002
Aceite esencial al 70%	8	13,50	0,89	12,5	14,5	84,0	
Sulfadiazina de plata al 1%	8	16,06	0,73	15,0	17,0	100,0	

La Tabla 7, muestra el efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late* frente a *Staphylococcus aureus*. Se aprecia que entre los aceites esenciales la concentración del 70% obtuvo el mayor diámetro promedio (13,5 mm), seguido del aceite al 50% con 13,30 mm y del aceite al 30% con un valor promedio de 13,0 mm. También se presentan los valores máximos y mínimos observados en cada grupo.

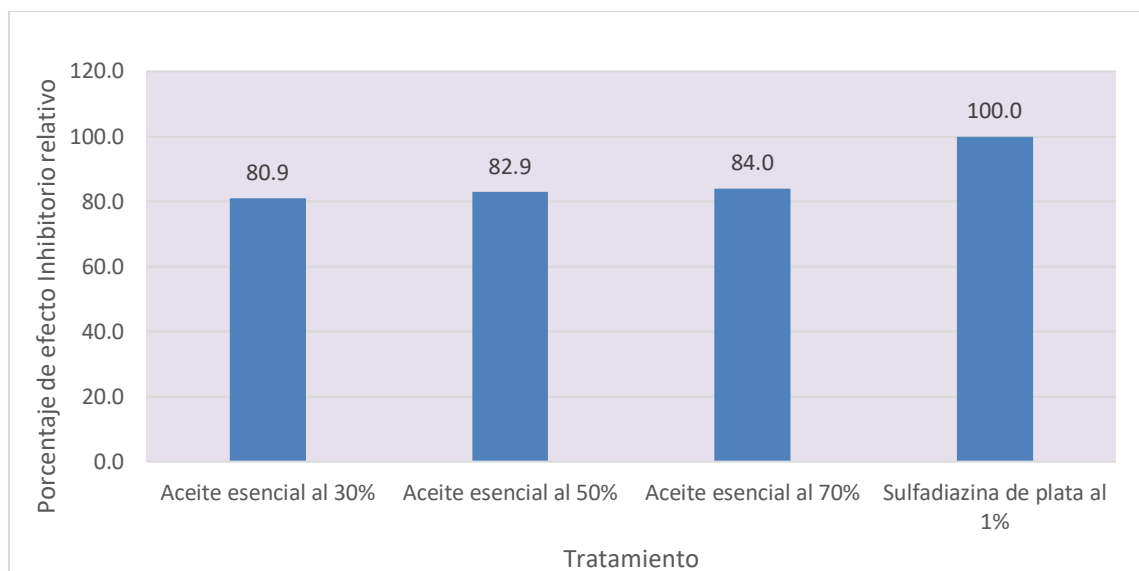
Así también, al evaluar la dispersión de los datos respecto a la media, se puede observar que el aceite a una concentración del 70% presenta una mayor desviación estándar ( $s=0,9$ ), la prueba de homogeneidad presenta un p valor menor a 0,05 lo cual permite concluir que las varianzas entre los 5 grupos son diferentes. Este resultado impide aplicar una prueba ANOVA para las comparaciones.





**Figura 10:** Nivel medio y dispersión del halo de inhibición sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

El diagrama de cajas permite observar que la distribución de los halos de inhibición en los tres aceites es superior al grupo control negativo, pero inferior al grupo Sulfadiazina de plata al 1%, además se observa una menor dispersión en el grupo de aceite esencial al 50%.



**Figura 11:** PEIR del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*

frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

La figura 11 muestra el porcentaje de Efecto Inhibitorio Relativo (PEIR) del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* con respecto a la Sulfadiazina de plata al 1%, donde el cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo de la manera siguiente:

$$PEIR = \frac{\text{media diámetro. halo inhib. del extracto} \times 100}{\text{media diámetro. halo inhib. del control positivo}}$$

El PEIR respecto a la Sulfadiazina de plata al 1% más elevado se observó en el aceite a concentración de 70% con un valor de 84,0%.

#### 4.6 Efecto Antibacteriano frente a la cepa de *Escherichia coli*.

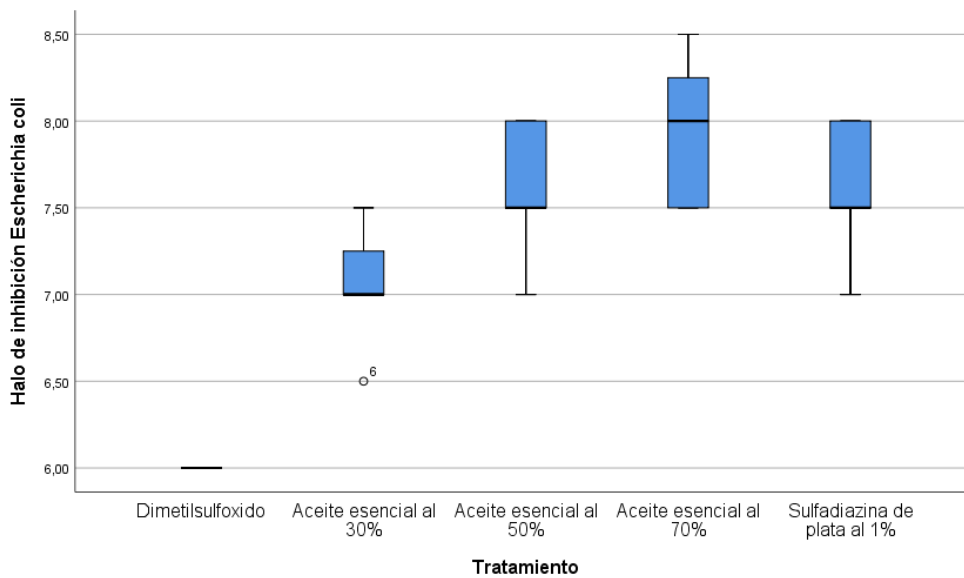
Tabla 8: Estadísticas descriptivas del diámetro de halo de inhibición sobre cepas de *Escherichia coli*

Tratamiento	n	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Prueba de homogeneidad de varianzas
Dimetilsulfoxido	8	6,00	0,00	6,0	6,0	
Aceite esencial al 30%	8	7,06	0,32	6,5	7,5	
Aceite esencial al 50%	8	7,63	0,35	7,0	8,0	0,009
Aceite esencial al 70%	8	7,94	0,42	7,5	8,5	
Sulfadiazina de plata al 1%	8	7,63	0,35	7,0	8,0	

La Tabla 8, muestra el efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late* frente a *Escherichia coli*. Se aprecia que en las 3 concentraciones 70, 50 y 30% de aceites esenciales se obtuvieron diámetro promedio

muy similares: mm, respectivamente. En general ningún valor supero los 8,5 mm lo cual indica un mínimo efecto antibacteriano.

Al evaluar la dispersión de los datos respecto a la media, se puede observar que los aceites presentan desviaciones similares, pero como el grupo control tiene desviación nula, la prueba de homogeneidad presenta un p valor menor a 0,05 lo cual permite concluir que las varianzas entre los 5 grupos son diferentes. Este resultado impide aplicar una prueba ANOVA para las comparaciones.



**Figura 12:** Nivel medio y dispersión del halo de inhibición sobre cepas de *Escherichia coli*, *in vitro*.

El diagrama de cajas permite observar que la distribución de los halos de inhibición en los tres aceites es apenas superior al grupo control negativo, y en el caso de los aceites a concentraciones del 50 y 70% los valores son similares a la Sulfadiazina de plata al 1%.

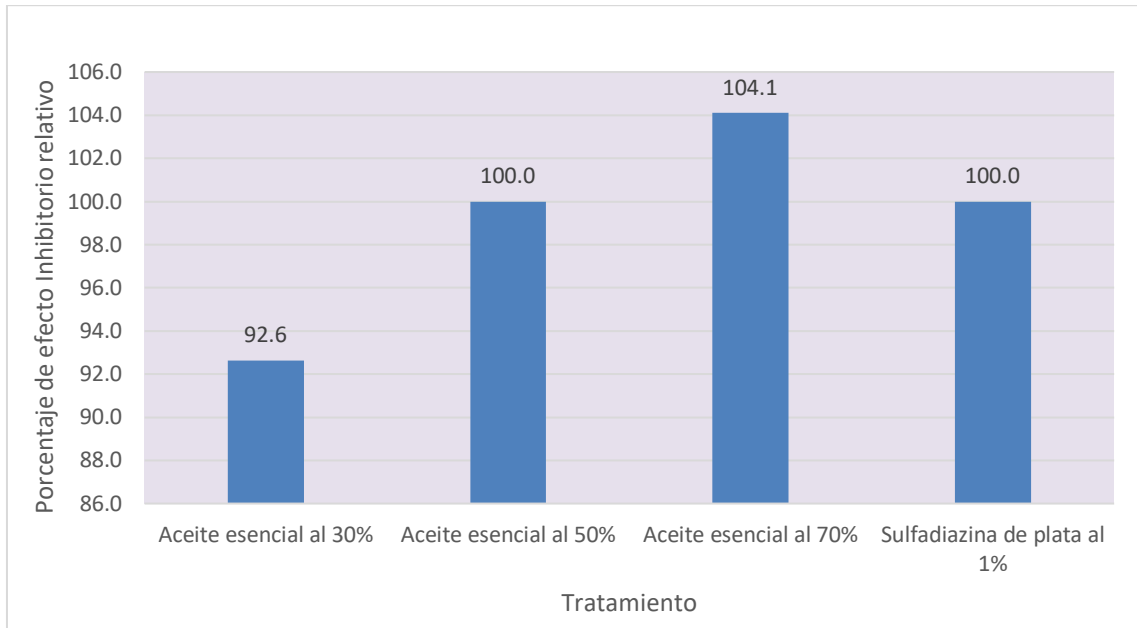


Figura 13: PEIR del aceite esencial de exocarpos de *Citrus sinensis* variedad Valencia Late frente a cepas de *Escherichia coli*, in vitro.

La figura 13 muestra el porcentaje de Efecto Inhibitorio Relativo (PEIR) del aceite esencial de exocarpos de *Citrus sinensis* variedad Valencia Late frente a cepas de *Escherichia coli*, in vitro con respecto a la Sulfadiazina de plata al 1%, el cual se calculó de la siguiente de la manera siguiente:

$$PEIR = \frac{\text{media diámetro. halo inhib. del extracto} \times 100}{\text{media diámetro. halo inhib. del control positivo}}$$

El PEIR más elevado respecto Dimetilsulfoxido se observó en el aceite a concentración de 70% con un valor de 104,1%.

#### 4.7 Contrastación de hipótesis de la actividad antimicrobiana frente a cepas de cepas de *Staphylococcus aureus*.

$H_0$  = No existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ( $p > 0.05$ )

$H_1$  = Existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ( $p < 0.05$ )

Tabla 9: Prueba de Kruskal Wallis efecto antibacteriano

Halo de inhibición <i>Staphylococcus aureus</i>	
H de Kruskal-Wallis	30,958
gl	4
p valor	0,000

La tabla 9 indica que mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis se obtiene un p valor menor a 0,05 por tanto se puede concluir que existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, es decir existe efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*. Para comparar y determinar los tratamientos con mayor actividad usaremos las comparaciones múltiples de Games Howell.

Tabla 10: Comparaciones múltiples del efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late* frente a *Staphylococcus aureus*

Variable dependiente	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	p valor
Halo de inhibición <i>Staphylococcus aureus</i>	Dimetilsulfoxido	Aceite esencial al 30%	-7,00*	0,000
		Aceite esencial al 50%	-7,31*	0,000
		Aceite esencial al 70%	-7,50*	0,000
	Aceite esencial al 70%	Aceite esencial al 30%	0,50	0,761
		Aceite esencial al 50%	0,18	0,988
		Aceite esencial al 70%	3,06*	0,000
	Sulfadiazina de plata al 1%	Aceite esencial al 30%	2,75*	0,000
		Aceite esencial al 50%	2,56*	0,000
		Aceite esencial al 70%	2,56*	0,000

La tabla 10 permite llegar a 3 conclusiones:

- Al comparar el grupo control negativo (Dimetilsulfoxido) con cada uno de los aceites esenciales se obtuvo un p valor menor a 0,05, esto significa que los tres aceites presentan un efecto antibacteriano significativo frente a cepas de cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Al comparar el aceite esencial de 70% versus los de concentración 50 y 30% se obtuvo un p valor no significativo (mayor a 0,05) esto significa que las tres concentraciones de aceites presentan un efecto antibacteriano similar frente a cepas de cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Al comparar el grupo control positivo (Sulfadiazina de plata al 1%) con cada uno de los aceites esenciales se obtuvo un p valor menor a 0,05, y una diferencia positiva, esto significa que los tres aceites presentan un efecto antibacteriano inferior a la Sulfadiazina de plata al 1% frente a cepas de cepas de *Staphylococcus aureus*.

#### 4.8 Contratación de hipótesis del efecto antibacteriano frente a cepas de cepas de *Escherichia Coli*

$H_0$  = No existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ( $p > 0.05$ )

$H_1$  = Existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ( $p < 0.05$ )

Tabla 11: Prueba de Kruskal Wallis efecto antibacteriano

Halo de inhibición <i>Staphylococcus aureus</i>	
H de Kruskal-Wallis	28,579
gl	4
p valor	0,000

La tabla 11 indica que mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis se obtiene un p valor menor a 0,05, por tanto, se puede concluir que existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, es decir existe efecto antibacteriano frente a *Escherichia Coli*. Para comparar y determinar los tratamientos con mayor actividad usaremos las comparaciones múltiples de Games Howell.

Tabla 12: Comparaciones múltiples del efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late* frente a *Escherichia Coli*.

Variable dependiente	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	p valor
Halo de inhibición <i>Escherichia coli</i>	Dimetilsulfoxido	Aceite esencial al 30%	-1,06*	0,000
		Aceite esencial al 50%	-1,63*	0,000
		Aceite esencial al 70%	-1,94*	0,000
	Aceite esencial al 70%	Aceite esencial al 30%	0,88*	0,003
		Aceite esencial al 50%	0,31	0,512
		Aceite esencial al 70%	0,56*	0,034
	Sulfadiazina de plata al 1%	Aceite esencial al 50%	0,00	1,000
		Aceite esencial al 70%	-0,31	0,512

La tabla 12 permite llegar a 3 conclusiones:

- Al comparar el grupo control negativo (Dimetilsulfoxido) con cada uno de los aceites esenciales se obtuvo un p valor menor a 0,05, esto significa que los tres aceites presentan un efecto antibacteriano significativo frente a cepas de cepas de *Escherichia Coli*.
- Al comparar el aceite esencial de 70% versus el aceite de concentración 30% se obtuvo un p valor significativo (menor a 0,05) esto significa que la concentración al 30% presenta un efecto antibacteriano muy inferior, al comparar versus el aceite al 50% se observa un p valor mayor a 0,05 lo cual indica que no existe diferencia entre el aceite esencial a concentraciones 70 y 50% respecto a su efecto antibacteriano frente a cepas de cepas de *Escherichia Coli*.
- Al comparar la Sulfadiazina de plata al 1% se observa que su efecto antibacteriano es similar al aceite esencial de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late* al 50 y 70%.



#### 4.8 Contratación de hipótesis de la actividad antioxidante

H<sub>0</sub>: El aceite esencial de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad Valencia Late no presenta la actividad antioxidante.

H<sub>1</sub>: El aceite esencial de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia Late* presenta la actividad antioxidante.

Tabla 13: Comparación del IC<sub>50</sub> Trolox versus Aceite esencial

Compuesto	IC 50 (µg/mL)
Estándar Trolox®	2,48
Aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> variedad Valencia Late	49 870,00

La tabla 13 permite concluir que la actividad antioxidante del Aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* es mínima debido a que se necesita una concentración veinte mil veces mayor en el aceite esencial para igualar la actividad del Trolox.

## V. DISCUSIÓN

Una vez realizados los experimentos de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* (naranja) de la presente investigación en base a los objetivos específicos planeados:

1. En lo que respecta al rendimiento del aceite esencial de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* se obtuvo un rendimiento de 1,14% para nuestra investigación, resultados parecidos a los reportados por Arroyo y Leon<sup>51</sup> los cuales obtuvieron un rendimiento de 1,29%, por destilación de arrastre a vapor de agua. Cabe resaltar que León Méndez<sup>52</sup> reporto rendimientos de 0,51 y 0,42 % para de *Citrus sinensis* L, por los métodos de hidrodestilación y extracción asistida con microondas, respectivamente, las mencionadas metodologías presentan bajos rendimientos debido que para extraer aceites esenciales con un peso molecular elevado (peso molecular de ácidos 192,12 g/mol), utilizándose presiones y temperaturas elevadas degradando los compuestos químicos del aceite esencial de naranja que son comúnmente de naturaleza volátil, entendiéndose que existe pérdida de los componentes de bajo peso molecular. Por otro lado Villa G. reportó rendimientos de 0.13 en un sistema de hidrodestilación por arrastre de vapor de agua, entendiéndose que existe pérdida de los componentes de bajo peso molecular por el método usado<sup>11</sup>.
2. Para determinar la presencia de metabolitos secundarios se realiza a través de un análisis cualitativo, aquí se pesaron entre aproximadamente 30-50 gramos de cascara cortada finamente, esta muestra se colocó en un vaso de precipitación y se colocaron 150 mL de éter etílico dejándose reposar por 48 horas, luego se procedió a filtrar, con el éter filtrado se usa como extracto para realizar los posteriores ensayos

Para evaluar los metabolitos secundarios se tuvo que pesar entre 30-50 gramos de cáscara trozada finamente. La muestra se coloca en un vaso de precipitación y se adicionan 150 mL de éter etílico dejándose reposar por 48

horas, cumplido el tiempo se procede a filtrar, el éter filtrado sería el extracto para realizar los diferentes ensayos de: sudan, dragendortf, Mayer, Wagner, lieberman-burchard. En el ensayo de Sudan se encontró la presencia de compuesto grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo. Por su parte en los ensayos de dragendortf, Mayer, Wagner se consideró también la presencia de opalescencia, turbidez definida o precipitado, por lo cual los ensayos dieron positivo. Por su parte el ensayo de lieberman-burchard tiene resultados positivos con un cambio de coloración rápido Rosado-azul muy rápido o Verde intenso u oscuro.

Por su parte la fracción no soluble de la extracción etérea, también se analizó realizando los ensayos de Shinoda con el cual se detectó la presencia de flavonoides. Por su parte con el ensayo Afrosimétrico se detecta La presencia de saponinas y por ultimo con el ensayo de Tricloruro férrico indica la presencia de compuesto fenólicos.

3. Entre los numerosos métodos para evaluar la actividad antioxidante se realizó el DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl), teniendo esto en cuenta, la actividad antioxidante del aceite esencial de naranja investigado se realizó mediante la prueba DPPH, porque este método es simple, reproducible y se usa ampliamente <sup>53</sup>. El aceite esencial de *Citrus limón* presenta eliminación media del radical DPPH a la concentración de 48.9%<sup>46</sup>, evidenciando que el aceite esencial de nuestra investigación *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* presenta una elevada actividad antioxidante comparada a otras especies de genero *Citrus*, pero no es significativa en comparación al estándar Trolox. La actividad antioxidante del aceite esencial de naranja fue parecida a lo reportado por Villa<sup>9</sup> para el ensayo de DPPH, presentando un IC50 de 33,2 uL/mL. Actualmente para comparar la actividad antioxidante existen diferentes estándares entre ellos, el Trolox, pero se puede comparar con otros estándares como el ácido salicílico, ácido cafeico, tyrosol, entre otros. La elección de un estándar depende de múltiples factores como el criterio de representación de metodologías, pero además existen factores como el tipo de muestra, y estabilidad del radical <sup>56</sup>.

4. En el efecto antibacteriano del aceite esencial a concentraciones de 30, 50 y 70% se evidenciaron halos de inhibición comprendidos entre 13 a 13,5 mm y 7,1 a 7,9 mm contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, cercanos al control positivo de sulfadiazina de plata al 1% con un valor promedio de 16 mm para *Staphylococcus aureus* y 7,6 mm para *Escherichia coli*.
  
5. El efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus* varía con la etapa de maduración de la fruta, siendo el aceite efectivo contra *Pseudomonas aeruginosa* solo cuando el aceite esencial se obtuvo de frutas maduras<sup>8, 14-16</sup>. En general, se reconoce que los productos (extractos o aceites esenciales) a base de plantas, específicamente *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*, si tienen propiedades antioxidantes y efectos antibacterianos, como se demostró en la presente investigación. En el efecto antibacteriano del aceite esencial a concentraciones de 30, 50 y 70% se evidenciaron halos de inhibición de 13 a 13,5 mm y 7,1 a 7,9 mm contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Saquinga D presenta zonas de inhibición de 11,16 mm; 11,26 mm y 14,84 mm de halo. Concluye que los tratamientos al 50%, 70% y 90% son efectivos,

## VI. CONCLUSIONES

Como conclusiones finales de la investigación se puede determinar en base a los objetivos específicos que:

1. Mediante el método de destilación por arrastre de vapor se pudo obtener el aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* reportando un rendimiento de 1,14%.
2. Con el análisis cualitativo del extracto hidroalcohólico y etéreo de las cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* se detectaron la presencia de metabolitos secundarios como triterpenos, alcaloides, flavonoides, azúcares reductores, saponinas y polifenoles.
3. La actividad antioxidante del aceite de cáscaras *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* fue expresada como IC<sub>50</sub> por el método DPPH obteniendo el resultado de 49 870 µg/mL., pero no es significativa en comparación al estándar Trolox.
4. Presenta efecto antibacteriano el aceite esencial de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late*, frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*. Pero un efecto inferior a la Sulfadiazina de plata al 1%, esto para las diluciones al 30, 50 y 70% del aceite.
5. Finalmente el efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* frente a las bacterias *Escherichia coli*, presenta un efecto antibacteriano significativo para las diluciones al 30, 50 y 70% , mientras que en el caso de las diluciones al 50 y 70% es comparable a la Sulfadiazina de plata al 1%

## VII. RECOMENDACIONES

1. Debido al resultado obtenido se sugiere continuar los estudios de investigación para el aislamiento y purificación de los fitoconstituyentes que permitan la posterior formulación de fitofármacos con efecto antibacteriano y actividad antioxidante, contribuyendo a una solución en la cadena del problema ambiental, reutilizando las cascaras.
2. Seguir realizando estudios sobre la actividad antioxidante del aceite esencial de cascaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* utilizando otros métodos y estándares para la evaluación de la misma.
3. Se puede proponer realizar modelos in vivo del aceite esencial con la finalidad de evaluar su eficacia y calidad.
4. Se puede crear cadenas de información con el fin de divulgar y capacitar a los vendedores y agricultores sobre la importancia de los aceites esenciales en diferentes partes de la geografía nacional a fin de generar una cadena productiva a partir del residuo de cascara de naranja, ya que según lo analizado en esta investigación sirven como un antibacteriano y antioxidante siendo una materia prima económica con gran potencial y futuro promisorio para agregar valor agregado en su cadena productiva.
5. Seguir realizando estudios sobre el efecto antibacteriano frente a otras cepas y aplicando otros métodos para ello.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS en medicina tradicional: 2014-2023. Ginebra: OMS; 2015.
2. Rojas J, Perea A, Stashenko E. Obtención de aceites esenciales y pectinas a partir de subproductos de jugos cítricos. Rev. de la facultad de Química Farmacéutica. Colombia [Internet]. 2009 [citado 2018 feb 24]. 16 (1): 110-115. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S01214004200900100013&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01214004200900100013&lng=en)
3. Cámara L, et al. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales contra *Streptococcus Mutans* y sus efectos antiproliferativos. Rev. Medicina complementaria y alternativa basada en evidencia. Brasil [Internet]. 2012 [citado 2018 febr 24]. 14(2):3-4. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/751435/>
4. Akhtar M, Degaga B, Azam T. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales extraídos de plantas medicinales contra los microorganismos patógenos: una revisión. Revista de Ciencias Biológicas y Pharmaceutical .Colombia.2014; 2 (1): 1-7.
5. Valdez V. Optimización del rendimiento y determinación del contenido de limoneno del aceite esencial de flavedo de mandarina. [Tesis]. [Perú]: Universidad San Ignacio de Loyola; 2017.89p.
6. Lira S. Producción de jugos y refrescos diversos crecerá 8.3% al cierre del 2014, según Maximixe.Gestion, [publicación periódica en línea] 2014. julio11. [Citado: 2018 Febrero 24];1(1)10pp.Disponible en:

<https://gestion.pe/economia/produccion-jugos-refrescos-diversos-crecera-8-3-cierre-2014-maximixe-65393-noticia/>

7. Abadie R, et al. Actividad antibacteriana de extractos vegetales frente a cepas intrahospitalarias, Iquitos-Perú. Rev. ECI Perú. [Internet]. 2014 Octubre 11 [citado 2018 febrero 24]. (1): 31-38 Disponible en: <https://revistas.eciperu.net/index.php/ECIPERU/article/view/37>
8. Muedas G. Estudio químico y actividad antioxidante de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. [Tesis Maestría]. Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú, Escuela de Posgrado; 2013. 154pp.
9. Ochoa k, et al. Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). Rev. Sci Agropecu. [Internet] 2012 [citado el 2018 febrero 22]; 3(4):291-302. Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/90/22>
10. Juárez J, et al Composición Química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (Naranja Dulce) y formulación de una forma farmacéutica. Ciencia e Investigación. [Internet]. 2010 [citado 2018 Feb 7]; 13(1): 9-13. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3157/2643>
11. Villa G. Composición química del aceite esencial de *Citrus paradisi* “Toronja”, actividad antioxidante y determinación de la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* [Tesis Maestría]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Escuela de Posgrado; 2017.
12. Villa G. Composición química del aceite esencial de *Citrus paradisi* “Toronja”, actividad antioxidante y determinación de la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* [Tesis Maestría]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Escuela de Posgrado; 2017.
13. Saquina D, Rosero M. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) sobre la cepa de *Staphylococcus aureus*. [Internet]. 2018 [Citado 2018 Agosto 10]; 12(1):01-63. Disponible: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/28463/1/Tesis%20141%20M%20edicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20590.pdf>



14. Argote V, et al. Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. [Internet]. 2017 [Citado 15 de Enero2018]; 15(2):52-60. Disponible:<http://revistabioteecnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/bioteecnologia/article/viewFile/593/>
15. Ehigbai I, et al. Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates [Internet].2016[Citado 2018 Marzo 10]; 12(1):01-07. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4708628/pdf/FSN3-4-103.pdf>
16. Guerra L, et al. Actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus sinensis*) var. Valencia frente a microorganismos gram positivos y gram negativos. Rev. Fac. Agron. (LUZ). [Internet]. 2014 [citado 20187 Feb 24]; 31: 215-232. Disponible en: <http://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/19011/18992>
17. Mercado P, Llenque L, Trujillo M. Sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a concentración de aceite de *Citrus reticulata* variedad Satsuma “mandarina”. Rev. Cien Tecno. [Internet] 2014 [citado 2018 febrero 20]; 10(2):61-71. Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/570/531>
18. Yañez X, Lugo L, Parada D. Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad Valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander, Colombia). Bistua: Rev. la Fac. Ciencias Básicas 2007;5(1): 3–8.
19. Pérez Acero J. Cultivo: Hortalizas y Frutales. Origen de la naranja, 2da edición. UNAD, Colombia, 2000.
20. Ladaniya M. Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation. Elsevier Inc., San Diego, 2008.
21. Lagha-Benamrouche S, Madani K. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: peels and leaves. Ind. Crops Prod. 2013 ;50(1): 723–730.

22. Kamran G, Youcef G, Ebrahimzadeh M. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2009;22(2): 277–281.
23. Manthey JA, Grohmann K. Phenols in citrus peel byproducts: concentration of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49(1):3268.
24. Sharma N, Tripathi A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol. Res.* 2008;163(1): 337–344.
25. Quiao Y, Xie B, Zhang Y, Zhang Y, Fan G, Yao X, Pan S. Characterization of aroma active compounds in fruit juice and peel oil of Jincheng sweet orange fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O. *Molecules* 2008;13(1); 1333–1344.
26. Mosandl A, Juchelka D. Advances in the Authenticity Assessment of Citrus Oils. *Journal of Essential Oil Research.* 1997;9(1):5-12.
27. Espina L, Somolinos M, Lóran S, Conchello P, García D, Pagán R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 2011;22(1): 896–902.
28. Sahraoui N, Abert M, El M, Boutekedjiret C, Chemat F. Valorization of citrus by-products using microwave steam distillation (MSD). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2011;12(1): 163–170.
29. Hosni K, Zahed N, Chrif R, Abid I, Medfei W, Kallel M, Ben N, Sebei H. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: evidence for the genotypic influence. *Food Chem.* 2010;123(1): 1098–1104.
30. Velázquez-Núñez MJ, Avila-Sosa R, Palou E, López-Malo A. Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, 2013; 31(1):1–4.
31. Espina L, Somolinos M, Lóran S, Conchello P, García D, Pagán R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control.* 2011;22(1); 896–902.
32. Moraes T, Kushima H, Moleiro F, Santos R, Machado Rocha L, Marques M et al. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric

- mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*. 2009;180(3):499-505.
33. Fisher K, Phillips C. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*. 2006;101(6):1232-1240.
  34. Bourgou S, Rahali F, Ourghemmi I, Saïdani Tounsi M. Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation. *The Scientific World Journal*. 2012;2012:1-10.
  35. Badarinath, AV, RA KM, Chetty CMS, Ramkanth, V, Rajan, TVS, Gnanaprakash, K. A review on *in-vitro* antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *Int. J. harmTech Res*. 2010;2 (2): 1276–1285.
  36. Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogen*. 1989;10(1). 1003– 1008
  37. Manzocco, L., Anese, M., Nicoli, M.C., 1998. Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *Lebens-mittel-Wissenschaft Und-Technologie* 31 (7–8), 694–698.
  38. Seeram NP, Henning SM, Lee R, Niu, Y, Scheuller HS, Heber D. Catechin and caffeine contents of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem*. 2006;54(1): 1599–1603.
  39. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*. 1999;299(1): 15–27
  40. Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferro-Luzzi A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic. Biol. Med*. 1995;18(1): 29–36.
  41. Treybal R. *Operaciones de Transferencia de Masa*. 7ma. Edición. Me Graw Hill; 2007.
  42. Socorro G, Avalos H, Soto M. *Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación*. Gen

- Microbiol *Staphylococcus Aureus* Charact Methods Identifying Pathog. [Internet] 2014; 25(3):129-43.
43. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.
44. J Hausdorfer, E Sompek, F Allerberger y col. E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2 (1998) 751–755.
45. AE Jiménez Esquilín, TM Roane. Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude Sagebrush Rhizosphere, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2005;32 (1): 378–381.
46. Villa G. Composición química del aceite esencial de Citrus “Toronja”, actividad antioxidante y determinación de la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* [Tesis Maestría]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Escuela de Posgrado; 2017.
47. Suárez S. Actividad captadora de radicales libres y efecto antioxidante de metabolitos secundarios del extracto acuoso del *Allium sativum* var. huaralino (ajo) en modelos in vitro. [Tesis de doctorado]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2014
48. Rojas J, García A, López A. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Colombia, Blacpma 2005; vol. 4, pág.29.
49. *Citrus sinensis* Linn Osbeck “naranja”. Disponible: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/tro-50149358>.
50. *Citrusn sinensis* Linn Osbeck “naranja” Missouri Botanical Garden, Missouri. Disponible: <http://www.tropicos.org/Name/50149358?tab=synonyms>
51. Arroyo Gomez y Leon La Rosa. DENSIDAD DE CARGA Y MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE ACEITE ESENCIAL DE LOS FLAVEADOS DE DOS VARIEDADES DE NARANJA (*CITRUS SINENSIS*) [Tesis para optar al título profesional de Ingeniería Industrial]. Perú: Universidad Nacional del Santa, Facultad de Ingeniería, 2014.

52. Leon Mendez, Osorio Fortich, Martinez Useche. Comparacion de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinesis* L. *Revista Cubana de Farmacia*. 2015;16(4):742-750.
53. H.S.Choi, H.S., Song, H.Ukeda and M. Sawamura, Radical scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4156-4161 (2000).
54. Priyanka Singh y col. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and chemical toxicology*. 2010;48(1):1734-1740.
55. Seun- Ah Yang. Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research*. 2010;24(2):1-5.
56. Cook A y col. Use of the Trolox assay to estimate the antioxidant content of seventeen edible wild plants of Niger. *Life Science*. 1996;63(2):105-10.



## IX. ANEXOS

### Anexo 1. Taxonomía de la especie



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

#### CONSTANCIA N° 36-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (fruto), recibida de **Miguel LUQUE LIPA** y **Rosalinda MARQUEZ VEGA**; de la Universidad Norbert Wiener; ha sido estudiada y clasificada como: ***Citrus x sinensis* (L.) Osbeck**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUB-CLASE: ROSIDAE**

**ORDEN: SAPINDALES**

**FAMILIA: RUTACEAE**

**GENERO: Citrus**


**ESPECIE: *Citrus x sinensis* (L.) Osbeck**

Nombre vulgar: "Naranja".

Determinado por: Blgo. Mario Julio Benavente Palacios

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 31 de enero de 2018

  
Mag. Asunción A. Cano Echevarría  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



## Anexo 2. Constancia de reactivación microbiológica.



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
*Spiritus ubi vult spirat*

### CONSTANCIA

*Quien suscribe hace constar que:*

Se han cumplido con todos los protocolos para la reactivación (24/48 horas) del microorganismo *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup> y *Staphylococcus aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923<sup>™</sup> la cual será utilizada para cumplir fines de investigación científica.

Se expende la presente constancia para los fines convenientes.

S.M.P. Lima, febrero del 2018



MSc. Maurtua Torres Dora  
Docente Microbiología – FCF - UPCH  
C.B.P. 0776

DJ/UPCH  
Archivos 108

**Anexo 3. Tratamiento de *Citrus sinensis* variedad Valencia Late (naranja).**

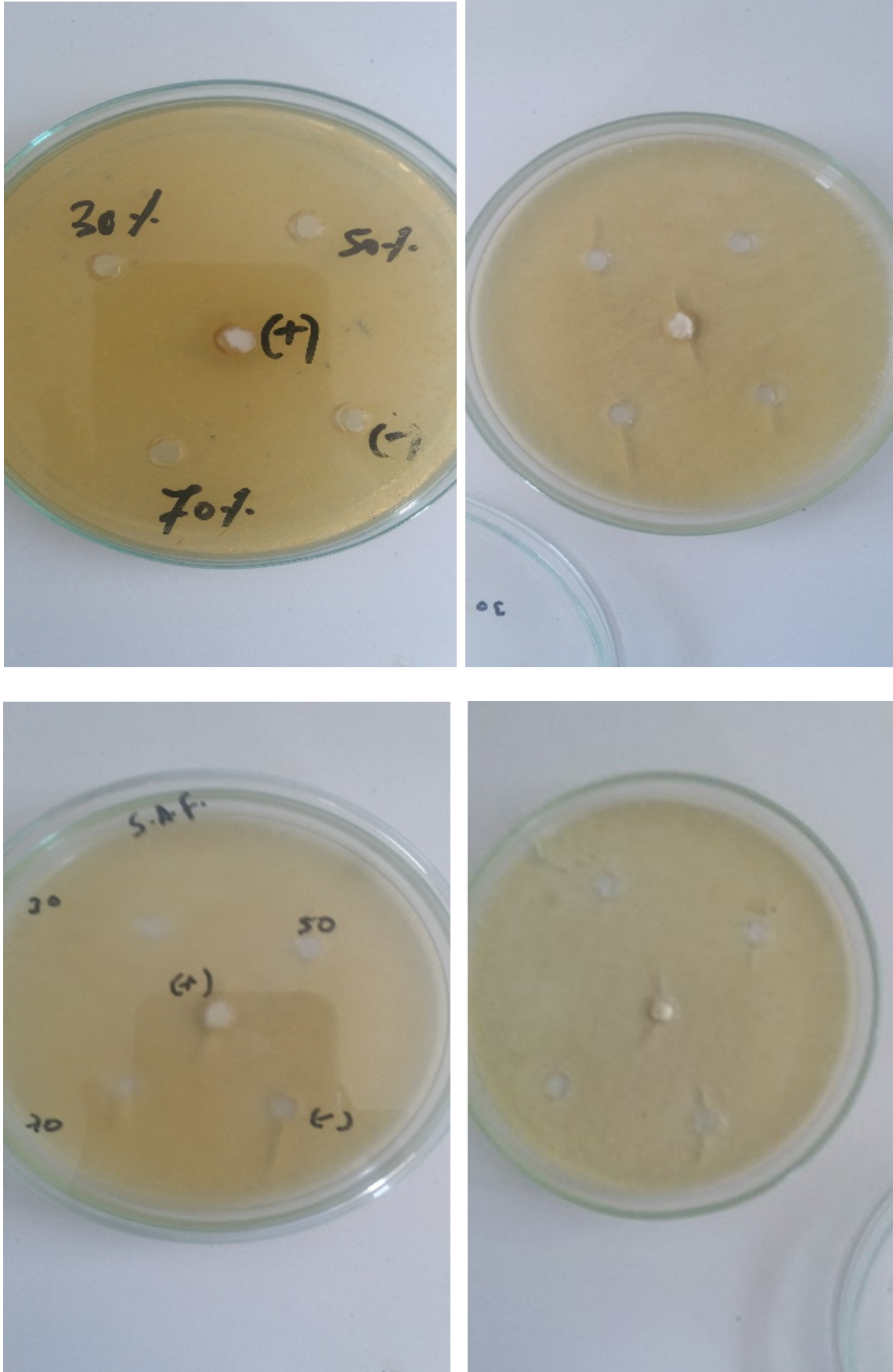




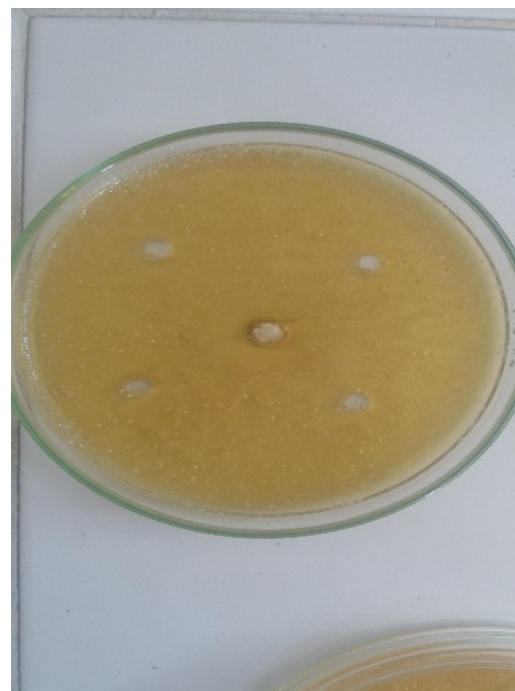
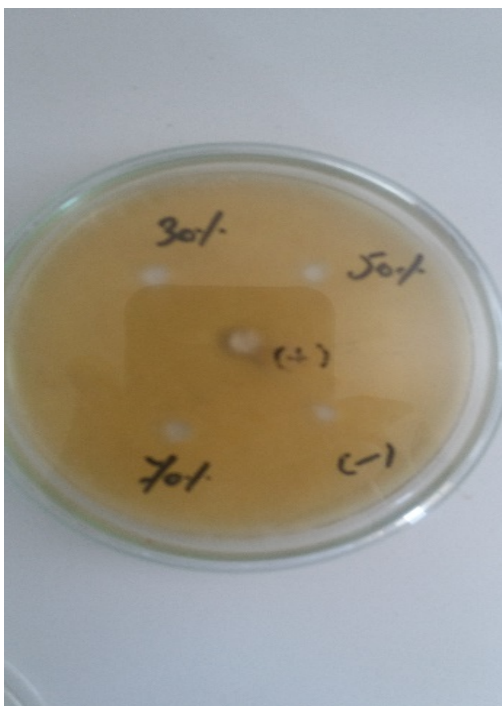
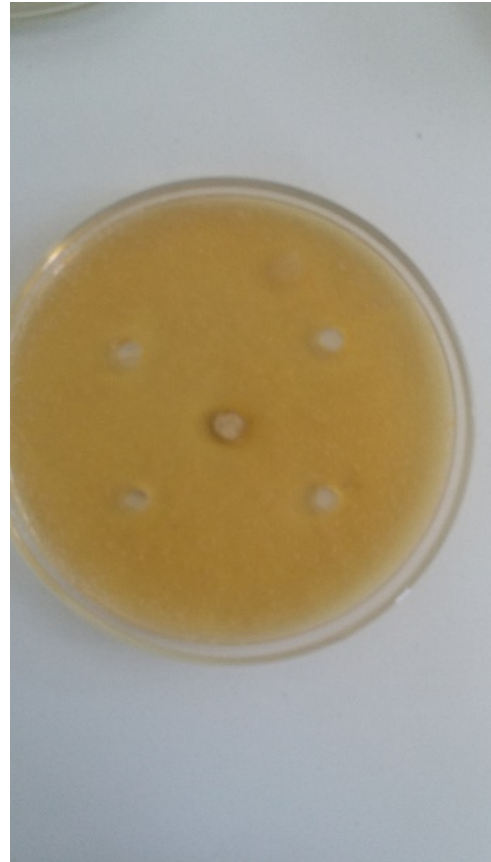
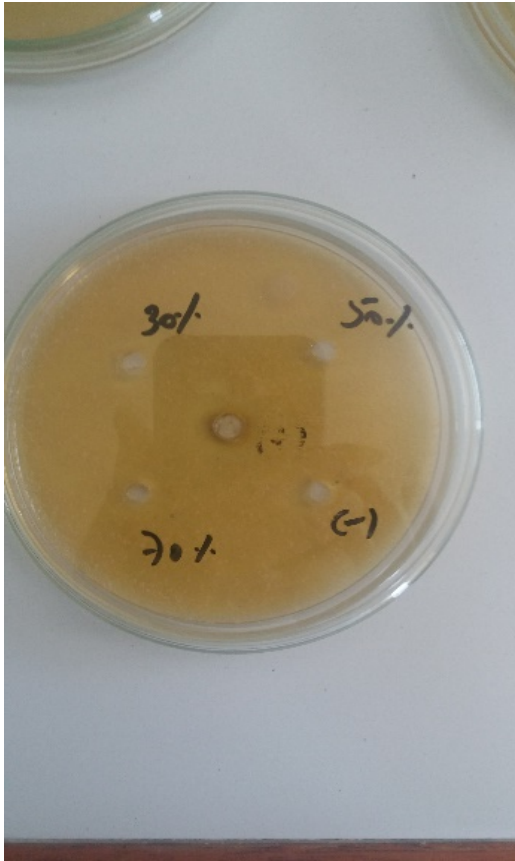
**Anexo 4. Obtención del aceite esencial de cáscaras de *Citrus Sinensis* variedad *Valencia late*.**



**Anexo 5. Actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad Valencia Late.**



**Anexo 6. Actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad Valencia Late.**



### Anexo 7. Mediciones del diámetro de inhibición.

n	Halo de inhibición Staphylococcus aureus	Halo de inhibición Escherichia coli	Grupo
1	6,0	6,0	Dimetilsulfoxido
2	6,0	6,0	Dimetilsulfoxido
3	6,0	6,0	Dimetilsulfoxido
4	6,0	6,0	Dimetilsulfoxido
5	6,0	6,0	Dimetilsulfoxido
6	6,0	6,0	Dimetilsulfoxido
7	6,0	6,0	Dimetilsulfoxido
8	6,0	6,0	Dimetilsulfoxido
9	12,0	6,5	Aceite esencial al 30%
10	12,5	7,0	Aceite esencial al 30%
11	12,0	7,0	Aceite esencial al 30%
12	13,0	7,0	Aceite esencial al 30%
13	13,5	7,0	Aceite esencial al 30%
14	13,0	7,0	Aceite esencial al 30%
15	14,0	7,5	Aceite esencial al 30%
16	14,0	7,5	Aceite esencial al 30%
17	12,5	7,0	Aceite esencial al 50%
18	14,5	7,5	Aceite esencial al 50%
19	13,0	7,5	Aceite esencial al 50%
20	14,0	7,5	Aceite esencial al 50%
21	13,0	7,5	Aceite esencial al 50%
22	13,0	8,0	Aceite esencial al 50%
23	13,5	8,0	Aceite esencial al 50%
24	13,0	8,0	Aceite esencial al 50%
25	13,5	7,5	Aceite esencial al 70%
26	12,5	7,5	Aceite esencial al 70%
27	12,5	7,5	Aceite esencial al 70%
28	14,5	8,0	Aceite esencial al 70%
29	12,5	8,0	Aceite esencial al 70%
30	14,5	8,0	Aceite esencial al 70%
31	14,0	8,5	Aceite esencial al 70%
32	14,0	8,5	Aceite esencial al 70%
33	17,0	7,5	Sulfadiazina de plata al 1%
34	15,0	7,0	Sulfadiazina de plata al 1%
35	17,0	7,5	Sulfadiazina de plata al 1%
36	16,0	7,5	Sulfadiazina de plata al 1%
37	15,5	8,0	Sulfadiazina de plata al 1%
38	16,5	7,5	Sulfadiazina de plata al 1%
39	16,0	8,0	Sulfadiazina de plata al 1%
40	15,5	8,0	Sulfadiazina de plata al 1%

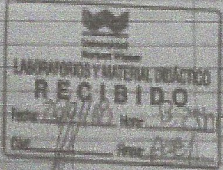


**Anexo 8. Materiales usados para el montaje del equipo de destilación.**

**UNIVERSIDAD NORBERT WIENER**  
**LABORATORIO DE QUÍMICA**  
**CURSO: Tesis**  
**SECCIÓN:**

**OBJETIVO DE MATERIALES**  
**DOCENTE: O.F. Antonio Ramos**  
**FECHA Y HORA: 29/04/2018 Hora: 9:00am a 12:00pm**

N°	DESCRIPCIÓN	PARA USO DOCENTE							DESCRIPCIÓN	PARA USO ESTUDIANTE						
		UN	UN	UN	UN	UN	UN	UN		UN	UN	UN	UN	UN		
1	Estufa	1	✓						termómetro	2	✓					
2	Socinula	2	✓						balón de 3 bocas	2	✓					
3	Martillo kilasato 210ml	2	✓						Yacilla	1	✓					
4	Vaso Precipitado 120ml	2	✓						para A. Análisis	2	✓					
5	Sorarter. Universales	3	✓						Tabla de pizar	2	✓					
6	Pinzas para Soplete	6	✓						Taladro	1	✓					
7	Anillo de hierro	2	✓						brochetas (Yacil)	2	✓					
8	Tejar de Asbesto	2	✓						in. regulan. tel.	2	✓					
9	Baquero bunsen	2	✓													
10	Mortero Erlenmeyer 100ml	3	✓						Botafuente MARGARITA							
11	Mortero 100ml	1	✓						VEGA							
12	Pipeta 10ml	3	✓													
13	Mortero con la Pichu	2	✓						MIGUEL LUGUE LIZ							
14	Clavo de hierro para el															
15	Tapan. horadado	2	✓													
16	Empuñadura para tetracloruro															
17	Tubo de manguera para															
18	CONEXIONES															
19	Trípode	2	✓													
20	Agua destilada															
21	Balón de 3 bocas	2	✓													
22	MePE durante	2	✓													



**Observaciones:**  
 - 1 pipeta 10ml → por falta de 506  
 - Tabla de pizar (2) → 506  
 - balón de 3 bocas (200ml) (200ml)

**Anexo 9. Actividad antioxidante frente al radical DPPH del aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* variedad *Valencia Late* .**



Derecha: Se puede observar la coloración violeta del radical DPPH.

Izquierda: La decoloración de los tubos pasado los 30 min del término de reacción en función a la concentración



Inmediatamente después, se realizan las lecturas de las absorbancias, las cuales se realizaron por triplicado, en un espectrofotómetro Génesis UV/VIS 10, se utilizaron cubetas de plástico.

## Anexo 10. Matriz de consistencia

Planteamiento de Problema	Objetivos	Hipótesis	Justificación	Variable
<p><b>Problema General</b></p> <p>¿Cuál será la actividad antioxidante y el efecto antibacteriano el aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis variedad Valencia Late</i>?</p>	<p><b>Objetivo General</b></p> <p>Evaluar la actividad antioxidante y efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis variedad Valencia Late</i></p> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Obtener el aceite esencial en cascaras de <i>Citrus Sinensis variedad Valencia Late</i> (naranja) por el método de destilación por arrastre de vapor.</li> <li>2. Determinar por análisis cualitativo la presencia de metabolitos secundarios del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis variedad valencia Late</i>.</li> <li>3. Determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis variedad Valencia Late</i> por el método de DPPH.</li> <li>4. Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis variedad Valencia Late</i> frente a <i>Staphylococcus Aureus</i>.</li> <li>5. Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis variedad Valencia Late</i> frente a <i>Escherichia Coli</i>.</li> </ol>	<p>El aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus sinensis variedad Valencia Late</i> presenta actividad antioxidante y efecto antibacteriano.</p>	<p>En el Perú, la acumulación de residuos sólidos y orgánicos se ha convertido un problema de salud pública, las mismas que conllevan a diferentes enfermedades y mayor contaminación ambiental. Los antioxidantes son compuestos los cuales pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas frenando la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres y las enfermedades bacterianas este hecho ha impulsado a encaminar una búsqueda de nuevos productos terapéuticos ante la necesidad de proteger al medio ambiente y mantenerlo intacto1-5.</p> <p>Ello nos enfoca al uso de productos orgánicos de desecho como las cáscaras de los cítricos la cual contienen el aceite esencial, conformado por metabolitos secundarios, dichos compuestos han atraído la atención a nivel industrial debido a su actividad antibacteriana y antioxidante26.</p> <p>Actualmente, la demanda de los aceites esenciales es incipiente en el Perú, por las altas características de calidad exigidas al producto y el alto nivel de integración a base de investigaciones científicas para tener con la cadena de valor. Por lo cual este trabajo propone la disminución de residuos orgánicos y productos derivados aprovechables, permitiendo contar con un recurso natural alternativo con propiedades antioxidantes y tratamiento de infecciones producidas por bacterias a partir de un producto natural e inocuo para la salud3</p>	<p>- <b>Independiente:</b></p> <p>El aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis variedad Valencia Late</i>.</p> <p><b>Dependiente:</b></p> <p>Actividad antioxidante y efecto antibacteriano.</p>



### Anexo 10. Operacionalización de variables

	VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADOR	INSTRUMENTO	ESCALA	FUENTE
I n d e p e n d i e n t e	Aceite esencial	El aceite esencial es una mezcla de líquidos volátiles, extraídos mediante múltiples técnicas de las cuales la más común es la destilación, tienen actividad antibacteriana	Obtención de aceite esencial	Aceite esencial de las cáscaras de naranja ( <i>Citrus Sinensis</i> ) variedad Valencia late(naranja)	Método de arrastre con vapor de agua	El aceite esencial de cáscaras de <i>Citrus Sinensis</i> variedad <i>Valencia Late</i>	Productos de composición generalmente muy compleja que contienen los principios volátiles que se encuentran en los vegetales más o menos modificados durante su preparación.	
D e p e n d i e n t e	Actividad Antioxidante	La actividad antioxidante tiene la capacidad para una sustancia inhibir la degradación oxidativa, de manera que un antioxidante actúa para reaccionar con radicales libres.	Capacidad antioxidante Reducción del radical, al enfrentarse a una sustancia de naturaleza antioxidante. Se mide la disminución del color como parámetro de la reacción.	Radicales libres	Disminución del color, disminución de absorbancias	Consiste que radicales libres de DPPH sustraen un átomo de hidrógeno proveniente de un donador y como consecuencia de esta reacción.	Cuantitativo	Coloración violeta a amarillo
	Efecto antibacteriano	Capacidad de una sustancia cualquiera para inhibir el crecimiento y/o producir la muerte de una o más bacterias.	Sensibilidad bacteriana: Grado de susceptibilidad de los microorganismos frente Aceite esencial de cáscaras de Citrus Sinensis variedad <i>Valencia Late</i> con la formación de un halo de inhibición.	Actividad Antibacteriana	Diámetro en milímetros (mm) del halo inhibición	Grado de sensibilidad	Cuantitativo continua	-Aceite esencial de cáscaras de Citrus Sinensis variedad Valencia Late - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Escherichia Coli</i>