

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL LIMONENO OBTENIDO DE  
RESIDUOS DE CÁSCARA DE NARANJA (*Citrus sinensis* [L.] OSBECK  
VARIEDAD VALENCIA) FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 8720 Y  
*Staphylococcus aureus* ATCC 6538

## **TESIS**

Presentada por:

**Bach. Enzo Javier Montoya Carita**

Para optar el Título Profesional de:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

TACNA – PERÚ

2024

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL LIMONENO OBTENIDO  
DE RESIDUOS DE CÁSCARA DE NARANJA (*Citrus sinensis* [L.]  
OSBECK VARIEDAD VALENCIA) FRENTE A *Escherichia coli*  
ATCC 8720 Y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538**

**TESIS**

Presentada por:

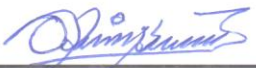
**Bach. ENZO JAVIER MONTOYA CARITA**


Para optar el Título Profesional de:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

Aprobada por UNANIMIDAD, ante el siguiente jurado

  
\_\_\_\_\_  
**Mgr. Juan Carlos Efraín Cervantes Zegarra**  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
**Mgr. Orlando Agustín Rivera Benavente**  
Miembro

  
\_\_\_\_\_  
**MSc. Juan José Vargas Mamani**  
Miembro

  
\_\_\_\_\_  
**MSc. Juan José Vargas Mamani**  
Asesor

## CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo **MSc. Juan José Vargas Mamani** en mi condición de asesor acreditado por la Resolución de Facultad N° 13040-2024-2022- FACS-UNJBG, de la tesis titulada:

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL LIMONENO OBTENIDO DE RESIDUOS DE CÁSCARA DE NARANJA (*Citrus sinensis* [L.] OSBECK VARIEDAD VALENCIA) FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 8720 Y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.**

Presentada por el Bach. Enzo Javier Montoya Carita, para optar el título profesional de: **QUÍMICO FARMACEÚTICO**

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajos de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual TURNITIN cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es 18%.


Por lo que CERTIFICO LA SIMILARIDAD de la ESCALA DE SIMILITUD de la tesis está de acuerdo a la **SIMILITUD BAJA: PERMITIDO**, para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio Institucional.

Se emite el presente certificado con fines de continuar con los trámites respectivos para su obtención del título.

Tacna, 13 de octubre del 2024

  
MSc. Juan José Vargas Mamani  
DNI: 42224279  
Asesor



  
Bach. Enzo Javier Montoya Carita  
DNI: 73880926  
Tesisista



## **DEDICATORIA**

“Dedicado a mi madre Rosa María a quien, antes de partir, le prometí darle este motivo más de orgullo, más allá de la muerte.”

## **AGRADECIMIENTO**

“Agradezco a Dios por haberme puesto en este camino, a mi madre por haberme acompañado, a mi padre por seguir a mi lado. Expreso mi profunda gratitud a mis hermanos por todo el apoyo, cuidado y cariño que hicieron de su hermano menor la persona esmerada que es hoy. Agradezco todo el conocimiento y experiencia a cada uno de mis docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, en especial a mi asesor, el Q.F. MSc. Juan José Vargas, por su exigencia y recomendaciones, las cuales fueron fundamentales para el éxito de esta tesis.”

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>DEDICATORIA</b>	iii
<b>AGRADECIMIENTO</b>	iv
<b>RESUMEN</b>	xvii
<b>ABSTRACT</b>	xviii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>CAPÍTULO 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	
1.1 Descripción del problema	3
1.2 Formulación del problema	
1.2.1 Problema principal	4
1.2.2 Problemas específicos	4
1.3 Justificación e importancia de la investigación	5
1.4 Alcances y limitaciones	6
1.5 Objetivos	
1.5.1 Objetivo general	7
1.5.2 Objetivos específicos	7
1.6 Hipótesis	
1.6.1 Hipótesis general	9
1.6.2 Hipótesis específicas	9
1.7 Variables	
1.7.1 Variable independiente	10
1.7.2 Variable dependiente	10
1.7.3 Indicadores	10
1.7.4 Definición operacional de las variables	10
<b>CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO</b>	
2.1 Antecedentes del estudio	
2.1.1 Antecedentes internacionales	12

2.1.2	Antecedentes nacionales	15
2.2	Bases teóricas	
2.2.1	Naranja	16
2.2.2	Naranja dulce	18
2.2.3	Venta ambulante de jugo de naranja	19
2.2.4	Aceites esenciales	20
2.2.5	Aceites esenciales de cítricos	21
2.2.6	Destilación de aceites esenciales	21
2.2.7	Destilación fraccionada	22
2.2.8	Cromatografía de gases con detección de masas	23
2.2.9	Limoneno	24
2.2.10	<i>Escherichia coli</i>	24
2.2.11	<i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.2.12	Método de Kirby-Bauer o método de difusión de disco	25
2.2.13	Concentración mínima inhibitoria	26
2.2.14	Concentración mínima bactericida	26
2.2.15	Prueba estadística F de análisis de varianza (ANOVA)	26
2.3	Definición de términos	
2.3.1	Venta ambulante	27
2.3.2	Hesperidio	27
2.3.3	Flavedo	27
2.3.4	Albedo	27
2.3.5	Hidrolato	28
2.3.6	Cepa	28
2.3.7	Halo de inhibición	28
<b>CAPÍTULO 3. MARCO METODOLÓGICO</b>		
3.1	Tipo, diseño y nivel de la investigación	
3.1.1	Tipo y diseño de la investigación	29
3.1.2	Nivel de la investigación	30
3.2	Población, muestra y muestreo	30

3.3 Materiales e instrumentos	
3.3.1 Materiales	30
3.3.2 Equipos e instrumentos	32
3.3.3 Insumos y reactivos	33
3.4 Procedimiento experimental	
3.4.1 Recolección de muestras de residuos de cáscara de naranja	34
3.4.2 Tratamiento de las muestras	36
3.4.3 Certificación de la especie de naranja	37
3.4.4 Extracción del aceite esencial por arrastre de vapor de agua	38
3.4.5 Obtención de limoneno por destilación fraccionada del aceite esencial	40
3.4.6 Análisis cromatográfico de gases con detección de masas de la fracción destilada	41
3.4.7 Caracterización fisicoquímica del limoneno	
3.4.7.1 Densidad	42
3.4.7.2 Solubilidad en metanol	43
3.4.7.3 Solubilidad en etanol 96°	43
3.4.7.4 Solubilidad en isopropanol	44
3.4.8 Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad antibacteriana del limoneno	44
3.4.8.1 Preparación bacteriana del inóculo	46
3.4.8.2 Preparación de los discos de sensibilidad	48
3.4.8.3 Preparación de los discos de sensibilidad con limoneno	49
3.4.8.4 Determinación del halo de inhibición (método Kirby-Bauer)	50
3.4.8.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria	51
3.4.8.6 Determinación de la concentración mínima bactericida	53
3.5 Técnicas de análisis de datos	54
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS</b>	
4.1 Rendimiento del aceite esencial de cáscara de naranja	55
4.2 Análisis cromatográfico de gases con detección de masas	55
4.3 Densidad del limoneno	58

4.4 Solubilidad del limoneno en metanol	58
4.5 Solubilidad del limoneno en etanol 96°	58
4.6 Solubilidad del limoneno en isopropanol	58
4.7 Halos de inhibición del limoneno frente a <i>E. coli</i>	60
4.8 Halos de inhibición del limoneno frente a <i>S. aureus</i>	63
4.9 Concentración mínima inhibitoria del limoneno frente a <i>E. coli</i>	66
4.10 Concentración mínima inhibitoria del limoneno frente a <i>S. aureus</i>	67
4.11 Prueba estadística F de análisis de varianza (ANOVA)	68
<b>CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN</b>	84
<b>CONCLUSIONES</b>	92
<b>RECOMENDACIONES</b>	94
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	95
<b>ANEXOS</b>	105

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Cantidades a mezclar para la preparación de las diluciones de limoneno a distintas concentraciones.	49
<b>Tabla 2.</b> Cantidades a mezclar para la preparación de los tubos de ensayo para la determinación de la CMI frente a <i>E. coli</i> con limoneno a distintas concentraciones.	52
<b>Tabla 3.</b> Cantidades a mezclar para la preparación de los tubos de ensayo para la determinación de la CMI frente a <i>S. aureus</i> con limoneno a distintas concentraciones.	53
<b>Tabla 4.</b> Halos de inhibición del limoneno frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8720.	60
<b>Tabla 5.</b> Halos de inhibición del limoneno frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	63
<b>Tabla 6.</b> Prueba de la concentración mínima inhibitoria del limoneno frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8720.	66
<b>Tabla 7.</b> Prueba de la concentración mínima inhibitoria del limoneno frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	67
<b>Tabla 8.</b> Media total ( $\bar{x}$ ) de los halos de inhibición del limoneno frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8720.	68
<b>Tabla 9.</b> Media total ( $\bar{x}$ ) de los halos de inhibición del limoneno frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	69
<b>Tabla 10.</b> Suma total de cuadrados (STC) con los cuadrados de la diferencia entre la media total (6,814) y el halo de inhibición de cada disco de limoneno frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8720.	70

<b>Tabla 11.</b> Suma total de cuadrados (STC) con los cuadrados de la diferencia entre la media total (8,04) y el halo de inhibición de cada disco de limoneno frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	71
<b>Tabla 12.</b> Suma total de cuadrados dentro de cada grupo (SCD) con los cuadrados de la diferencia entre el promedio de cada concentración y el halo de inhibición de cada disco de limoneno frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8720.	73
<b>Tabla 13.</b> Suma total de cuadrados dentro de cada grupo (SCD) con los cuadrados de la diferencia entre el promedio de cada concentración y el halo de inhibición de cada disco de limoneno frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	74
<b>Tabla 14.</b> Suma total de cuadrados entre cada grupo (SCE) con los cuadrados del número de datos por grupo multiplicado por la diferencia entre la media total (6,814) y el promedio de cada concentración de cada disco de limoneno frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8720.	75
<b>Tabla 15.</b> Suma total de cuadrados entre cada grupo (SCE) con los cuadrados del número de datos por grupo multiplicado por la diferencia entre la media total (8,04) y el promedio de cada concentración de cada disco de limoneno frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	76
<b>Tabla 16.</b> Resumen de los cálculos obtenidos del desarrollo de la prueba estadística F.	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Página 1/2 del informe de ensayo.	56
<b>Figura 2.</b> Página 2/2 del informe de ensayo.	57
<b>Figura 3.</b> Ensayo de solubilidad del limoneno en metanol (izquierda), etanol (centro) e isopropanol (derecha).	59
<b>Figura 4.</b> Distribución de promedios de los halos de inhibición del limoneno frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8720.	61
<b>Figura 5.</b> Dispersión de promedios y correlación lineal de los halos de inhibición del limoneno frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8720.	62
<b>Figura 6.</b> Distribución de promedios de los halos de inhibición del limoneno frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	64
<b>Figura 7.</b> Dispersión de promedios y correlación lineal de los halos de inhibición del limoneno frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	65
<b>Figura 8.</b> Tabla de valores críticos de la distribución F ( $\alpha = 0,05$ ).	78
<b>Figura 9.</b> Tabla de valores críticos de la distribución F ( $\alpha = 0,01$ ).	79

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo 1.</b> Carro ambulante de venta de jugo de naranja en el Mercado Mayorista Grau.	106
<b>Anexo 2.</b> Jaba de madera con naranjas que se expenden en los puestos de frutas ubicados en el exterior del Mercado Mayorista Grau.	107
<b>Anexo 3.</b> Naranja dulce.	108
<b>Anexo 4.</b> Diámetro y aspecto de la naranja dulce.	109
<b>Anexo 5.</b> Corte transversal y longitudinal de la naranja dulce.	110
<b>Anexo 6.</b> Proceso de pelado de una naranja en un puesto ambulante.	111
<b>Anexo 7.</b> Ancho de una tira de cáscara de naranja.	112
<b>Anexo 8.</b> Tiras de cáscara de naranja.	113
<b>Anexo 9.</b> Adquisición de la muestra en un puesto ambulante de venta de jugo de naranja dentro del Mercado Mayorista Grau.	114
<b>Anexo 10.</b> Adquisición de la muestra en un puesto ambulante de venta de jugo de naranja dentro del Mercado Mayorista Grau.	115
<b>Anexo 11.</b> Adquisición de la muestra en un puesto ambulante de venta de jugo de naranja dentro del Mercado Mayorista Grau.	116
<b>Anexo 12.</b> Extendido de las tiras de cáscara de naranja.	117
<b>Anexo 13.</b> Corte y disposición de la muestra dentro de las bandejas de deshidratación.	118
<b>Anexo 14.</b> Deshidratación de las muestras de cáscara de naranja.	119
<b>Anexo 15.</b> Tira de cáscara de naranja deshidratada.	120
<b>Anexo 16.</b> Muestra de cáscara de naranja deshidratada.	121

<b>Anexo 17.</b> Constancia de identificación taxonómica de la especie de naranja.	122
<b>Anexo 18.</b> Equipo casero de extracción de aceite esencial por arrastre de vapor de agua.	123
<b>Anexo 19.</b> Pesaje de muestra.	124
<b>Anexo 20.</b> Muestra dentro de la olla luego de haberle extraído el aceite esencial.	125
<b>Anexo 21.</b> Bomba de agua del sistema de refrigeración.	126
<b>Anexo 22.</b> Cubeta con hielo, detrás el balde del sistema de refrigeración.	127
<b>Anexo 23.</b> Destilado y separación de fases siendo realizadas al mismo tiempo.	128
<b>Anexo 24.</b> Muestra de aceite esencial extraído en un día.	129
<b>Anexo 25.</b> Páginas de la bitácora con el registro de las extracciones de aceite esencial.	130
<b>Anexo 26.</b> Total de aceite esencial obtenido luego de 20 extracciones.	131
<b>Anexo 27.</b> Equipo de destilación fraccionada Glassco de 250 mL.	132
<b>Anexo 28.</b> Primera destilación fraccionada del limoneno en pleno proceso.	133
<b>Anexo 29.</b> Toma de muestra de las fracciones.	134
<b>Anexo 30.</b> Segunda destilación fraccionada llevada a cabo a 175 °C.	135
<b>Anexo 31.</b> Paquete de envío con la muestra de la fracción destilada a 175 °C.	136
<b>Anexo 32.</b> Cálculo de la densidad del limoneno.	137
<b>Anexo 33.</b> Ensayo de solubilidad del limoneno en diferentes alcoholes.	138
<b>Anexo 34.</b> Agitación de la mezcla para la determinación de la solubilidad del limoneno en diferentes alcoholes.	139

<b>Anexo 35.</b> Tubos de ensayo con la mezcla en emulsión (etanol) al lado de otros tubos de ensayo con mezclas completamente solubilizadas.	140
<b>Anexo 36.</b> Vestimenta del autor en el desarrollo de los trabajos dentro del laboratorio de Microbiología.	141
<b>Anexo 37.</b> Medios de cultivo empleados en el ensayo: caldo Infusión Cerebro Corazón (izquierda), agar Müeller Hinton (centro) y agar Nutritivo (derecha).	142
<b>Anexo 38.</b> Tubos de ensayo con caldo BHI.	143
<b>Anexo 39.</b> Preparación del agar Müeller Hinton.	144
<b>Anexo 40.</b> Preparación de las placas con agar Müeller Hinton.	145
<b>Anexo 41.</b> Preparación de agar Nutritivo en viales con un ángulo de inclinación de 45°.	146
<b>Anexo 42.</b> Preparaciones de los medios de cultivo forradas y rotuladas.	147
<b>Anexo 43.</b> Proceso de esterilización en autoclave.	148
<b>Anexo 44.</b> Viales con <i>Escherichia coli</i> (izquierda) y <i>Staphylococcus aureus</i> (derecha).	149
<b>Anexo 45.</b> Primer paso: preparación de la suspensión del agente bacteriano.	150
<b>Anexo 46.</b> Proceso de incubación.	151
<b>Anexo 47.</b> Segundo paso: preparación de cultivo en vial con la suspensión del agente bacteriano por siembra en estría y agotamiento.	152
<b>Anexo 48.</b> Tercer paso: preparación de la suspensión final del agente bacteriano.	153
<b>Anexo 49.</b> Nefelometría de McFarland.	154
<b>Anexo 50.</b> Discos de sensibilidad inactivados.	155
<b>Anexo 51.</b> Preparación de los discos de sensibilidad con las diluciones de limoneno.	156

<b>Anexo 52.</b> Inoculación de la suspensión bacteriana.	157
<b>Anexo 53.</b> Siembra por diseminación en superficie.	158
<b>Anexo 54.</b> Colocación de los discos de sensibilidad en las placas.	159
<b>Anexo 55.</b> Medición de los halos de inhibición (en la imagen, control positivo para <i>S. aureus</i> ).	160
<b>Anexo 56.</b> Placas de control positivo y negativo para <i>E. coli</i> .	161
<b>Anexo 57.</b> Placas de control positivo y negativo para <i>S. aureus</i> .	162
<b>Anexo 58.</b> Preparación de las diluciones para la determinación de la CMI.	163
<b>Anexo 59.</b> Resultados de la determinación de la CMI para <i>E. coli</i> .	164
<b>Anexo 60.</b> Resultados de la determinación de la CMI para <i>S. aureus</i> .	165

## RESUMEN

La presente investigación se propuso determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del limoneno obtenido de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia) frente a *Escherichia coli* ATCC 8720 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. El estudio fue de tipo experimental, prospectivo, transversal y analítico, en el cual se tomaron muestras aleatorias de residuos de cáscara de naranja de 5 puestos ambulantes de venta de jugo de naranja del Mercado Mayorista Grau, se deshidrataron, se les extrajo el aceite esencial por arrastre de vapor de agua, se destiló una fracción del aceite esencial a 175 °C, se analizó por cromatografía de gases dicha fracción, obteniendo como resultado una composición química del 100% limoneno. Fue evaluada la actividad *in vitro* del limoneno frente a *E. coli* y *S. aureus*. Se obtuvieron los mayores halos de inhibición de 7,73 mm con limoneno al 30% frente a *E. coli* y de 10,26 mm con limoneno al 100% frente a *S. aureus*. Frente a ambas cepas, el limoneno a distintas concentraciones no pudo inhibir *in vitro* el crecimiento bacteriano (CMI). En conclusión, el limoneno presentó poca actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

**Palabras clave:** *Citrus sinensis*, limoneno, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, halo de inhibición, CMI.

## ABSTRACT

The present investigation aimed to determine the *in vitro* antibacterial activity of limonene obtained from orange peel waste (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck variety Valencia) against *Escherichia coli* ATCC 8720 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. The study was experimental, prospective, cross-sectional and analytical, in which random samples of orange peel residues were taken from 5 orange juice stalls at the Grau Wholesale Market, dehydrated, the essential oil was extracted by steam dragging, a fraction of the essential oil was distilled at 175 °C, and analyzed by gas chromatography, obtaining as a result a chemical composition of 100% limonene. The *in vitro* activity of limonene against *E. coli* and *S. aureus* was evaluated. The highest inhibition halos of 7,73 mm were obtained for 30% limonene against *E. coli* and 10,26 mm for 100% limonene against *S. aureus*. Against both strains, limonene at different concentrations could not inhibit *in vitro* bacterial growth (MIC). In conclusion, limonene showed little *in vitro* antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

**Keywords:** *Citrus sinensis*, limonene, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, inhibition halo, MIC.

## INTRODUCCIÓN

En el Perú no existe una gran cultura del reciclaje, esto puede deberse a muchos factores como la educación, la falta de inversión, la gestión pública, entre otros, pero el más importante respecto a la investigación es que no se realizan estudios notables enfocados en obtener productos a partir de residuos orgánicos, ni se desarrollan empresas de este rubro que generen una alta rentabilidad y que a la vez solucionen problemas ambientales.

En el presente trabajo de investigación se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* del limoneno obtenido a partir de residuos de cáscara de naranja producto de la venta ambulante de jugo frente a *Escherichia coli* ATCC 8720 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 como una forma de conocer una de las tantas aristas que tiene este desaprovechado recurso ecológico y a la vez darle realce para que futuros investigadores que dispongan de más recursos se inclinen por estudiar más sus propiedades y potenciales usos en el área de la salud.

Esta investigación se divide en cuatro capítulos. En el primer capítulo se trata el problema principal, se presenta la justificación que responde al motivo y propósito de esta investigación, así también se presentan las hipótesis y los objetivos propuestos.

En el segundo capítulo se aborda los antecedentes del estudio, el marco teórico que guía el desarrollo de la investigación a nivel conceptual.

En el tercer capítulo se desarrolla el marco metodológico, incluyendo la operacionalización de las variables, la metodología empleada, el tipo de estudio, el diseño de investigación, la población objeto de estudio, las técnicas e instrumentos para la toma de datos, las observaciones realizadas y los métodos analíticos.

En el cuarto capítulo se presentan los resultados del estudio, desarrollando la discusión y el análisis comparativo con los antecedentes y teorías previamente expuestas.

En el quinto capítulo se realiza la discusión de los resultados obtenidos frente a los de otros autores, así como de las técnicas y métodos llevados a cabo.

Finalmente, se exponen las conclusiones de esta investigación, considerando al limoneno como un agente no bactericida frente a *Escherichia coli* ATCC 8720 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 pero resaltando su rendimiento, obtención y pureza, alentando al desarrollo de más investigaciones respecto a este recurso natural ecológico.

# **CAPÍTULO I**

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA**

El aprovechamiento de los residuos orgánicos es un tema poco tomado en cuenta a la hora de investigar nuevas sustancias de las cuales obtener alguna utilidad farmacéutica. Casi todos los trabajos de investigación sobre aceites esenciales se inclinan por el estudio de especies botánicas conocidas o poco conocidas, sin reparar en el rendimiento de la extracción, la purificación del principio activo ni la viabilidad de su producción a gran escala.

El limoneno es un terpeno muy conocido, usado en la industria alimentaria como aromatizante y saborizante; en la industria química y de plásticos como solvente orgánico desengrasante; en la industria de limpieza como desengrasante y desinfectante; y en la industria farmacéutica como excipiente de muchas formulaciones. Sin embargo, en los últimos años se ha investigado al limoneno como un potencial compuesto anticancerígeno natural, con actividad quimiopreventiva, estimulando la desintoxicación de compuestos cancerígenos y limitando el crecimiento tumoral y la angiogénesis en varios modelos de cáncer (1). Se destaca así al limoneno como una

molécula natural, abundante, de baja toxicidad, con múltiples utilidades industriales y diversas propiedades farmacológicas.

El presente informe de tesis pretende innovar respecto a los clásicos trabajos de investigación de aceites esenciales, con la esperanza de que los resultados de esta investigación sirvan de base científica para otros estudios y que resulte en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos hechos a base de limoneno ecológico.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

### **1.2.1. Problema principal**

¿Tendrá actividad antibacteriana *in vitro* el limoneno obtenido de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia) frente a *Escherichia coli* ATCC 8720 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538?

### **1.2.2. Problemas específicos**

¿Tendrá actividad antibacteriana *in vitro* el limoneno obtenido de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia) frente a *Escherichia coli* ATCC 8720?

¿Tendrá actividad antibacteriana *in vitro* el limoneno obtenido de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* [L.]

Osbeck variedad Valencia) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538?

### **1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN**

La venta ambulante de jugo de naranja es uno de los trabajos más comunes de encontrar en los mercados y zonas comerciales de nuestra ciudad. En estos puestos ambulantes se produce, además de litros de jugo de naranja, tiras de cáscara fresca de aproximadamente 10 mm de ancho que algunas veces las venden muy barato a personas que la solicitan para su uso en repostería, en saunas, en hornos de carbón y de leña, en alimento para ganado, entre otros, pero que muchas otras veces las desechan directamente al contenedor de basura por no encontrarles ninguna otra utilidad.

La composición fisicoquímica de la cáscara de naranja la convierte en un recurso orgánico con muchos usos, tales como biomasa para la producción de composta por su alto contenido de carbohidratos (2), como materia prima para la producción industrial de pectina y alcohol; y en la producción de limoneno, componente principal (>90%) del aceite esencial de la cáscara de naranja (3), el cual posee muchos otros usos como solvente orgánico, aromatizante, desinfectante, aditivo alimentario, entre otros que en la actualidad se siguen investigando (4). Además, su capacidad biodegradable y su

bajo nivel de toxicidad general permite su empleo en el área de la salud y en la industria farmacéutica (5).

Frente al problema diario de los residuos de cáscara de naranja, hoy en día desaprovechado y poco explotado, y el creciente interés de las industrias por dejar de lado los productos sintéticos para optar por productos ecológicos y sostenibles de origen natural, el presente proyecto de tesis pretende darle un valor farmacéutico a este recurso al obtener el aceite esencial de estos residuos, purificarlo por destilación fraccionada para la obtención de limoneno, determinar su pureza por análisis cromatográfico de gases y finalmente evaluar su actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Escherichia coli* ATCC 8720 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, bacterias gramnegativa y grampositiva respectivamente, de notable interés patológico.

#### **1.4. ALCANCES Y LIMITACIONES**

##### **Alcances**

La presente investigación permite conocer cuál es la actividad frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* del limoneno obtenido a partir del aceite esencial extraído de residuos de cáscara de naranja y cuyos resultados se espera que sean de mucha utilidad para que se realicen más investigaciones que amplíen el conocimiento acerca de este potencial recurso ecológico.

## **Limitaciones**

La investigación se vio limitada económicamente por la carencia de medios de cultivo y cepas bacterianas con las cuales poder realizar pruebas en más especies, así como por la falta de equipos y reactivos con los cuales poder realizar más pruebas fisicoquímicas y de análisis.

## **1.5. OBJETIVOS**

### **1.5.1. Objetivo general**

Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del limoneno obtenido de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia) frente a *Escherichia coli* ATCC 8720 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

### **1.5.2. Objetivos específicos**

- ∞ Determinar el halo de inhibición del limoneno obtenido de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia) frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.
- ∞ Determinar el halo de inhibición del limoneno obtenido de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

- ∞ Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del limoneno obtenido de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia) frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.
- ∞ Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del limoneno obtenido de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
- ∞ Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) del limoneno obtenido de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia) frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.
- ∞ Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) del limoneno obtenido de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

## 1.6. HIPÓTESIS

### 1.6.1. Hipótesis general

El limoneno obtenido de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia) posee actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Escherichia coli* ATCC 8720 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

### 1.6.2. Hipótesis específicas

- ∞ El limoneno produce *in vitro* un halo de inhibición frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.
- ∞ El limoneno produce *in vitro* un halo de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
- ∞ El limoneno inhibe *in vitro* el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 8720.
- ∞ El limoneno inhibe *in vitro* el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
- ∞ El limoneno elimina *in vitro* a la bacteria *Escherichia coli* ATCC 8720.
- ∞ El limoneno elimina *in vitro* a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

## **1.7. VARIABLES**

### **1.7.1. Variable independiente**

Limoneno obtenido de residuos de cáscara de naranja  
(*Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia).

### **1.7.2. Variable dependiente**

- Actividad antibacteriana *in vitro* del limoneno frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.
- Actividad antibacteriana *in vitro* del limoneno frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

### **1.7.3. Indicadores**

- Rendimiento de aceite esencial
- Pureza del limoneno
- Diámetro del halo de inhibición
- Concentración mínima inhibitoria
- Concentración mínima bactericida

### **1.7.4. Definición operacional de las variables**

Véase la siguiente página.

Variable	Definición	Dimensión	Indicador	Escala
<b>Variable independiente</b>	Limóneno obtenido de residuos de cáscara de naranja ( <i>Citrus sinensis</i> [L.] Osbeck variedad Valencia).	Cuantitativa	Rendimiento de aceite esencial	Medido en porcentaje masa/volumen
	Terpeno natural presente en la cáscara de los frutos cítricos y que les da su característico aroma.	Cualitativa	Pureza del limóneno	Cromatografía gaseosa con detección de masas
<b>Variable dependiente</b>	Capacidad del limóneno obtenido de residuos de cáscara de naranja ( <i>Citrus sinensis</i> L.) de eliminar o inhibir el crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> en un medio dado.	Cuantitativa	Diámetro del halo de inhibición	Medido en mm.
	Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del limóneno frente a <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8720).	Semicuantitativa	Concentración mínima inhibitoria	Nula (-) Sensible (+) Muy sensible (++) Sumamente sensible (+++)
	Capacidad del limóneno obtenido de residuos de cáscara de naranja ( <i>Citrus sinensis</i> L.) de eliminar o inhibir el crecimiento bacteriano de <i>S. aureus</i> en un medio dado.	Cuantitativa	Concentración mínima bactericida	Medido en mg/mL
	Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del limóneno frente a <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538).	Cuantitativa	Diámetro de halo de inhibición	Medido en mm.
<b>Variable dependiente</b>	Capacidad del limóneno obtenido de residuos de cáscara de naranja ( <i>Citrus sinensis</i> L.) de eliminar o inhibir el crecimiento bacteriano de <i>S. aureus</i> en un medio dado.	Semicuantitativa	Concentración mínima inhibitoria	Nula (-) Sensible (+) Muy sensible (++) Sumamente sensible (+++)
	Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del limóneno frente a <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538).	Cuantitativa	Concentración mínima bactericida	Medido en mg/mL

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

##### 2.1.1. Antecedentes internacionales

En Cartagena, León y colaboradores (2023) en su estudio **“Development of an antibacterial impregnated support using *Citrus sinensis* essential oil as active ingredient”** desarrollaron un soporte antibacteriano impregnado con aceite esencial de naranja como principio activo. Observaron que la formulación idónea a concentración de 2% de aceite esencial de naranja presenta actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (6).

En Brazil, Oliveira y colaboradores (2021) en su estudio **“Mechanism of action of various terpenes and phenylpropanoids against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*”** observaron una actividad antibacterial del limoneno únicamente frente a *S. aureus*, con una CMI y CMB de 21 µg/mL (7).

En Rumania, Man y colaboradores (2019) en su estudio **“Antimicrobial activity of six essential oils against a group**

**of human pathogens: a comparative study**” compararon diferentes aceites esenciales y su actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas. Observaron que el monoterpeno D-limoneno sintético y el obtenido de especies del género *Citrus* posee un alto índice bactericida para *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y en el género *Streptococcus*, y fungicida para *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* (8). Entre los factores que intervienen en el efecto inhibitorio del D-limoneno están la temperatura y el pH. En este sentido, Espina et al. en 2013 mostraron que el pH = 4 potencializó el efecto bactericida sobre *E. coli*. También se reportó que el limoneno emulsificado inhibió a bacterias patógenas transmitidas por alimentos (9).

En Colombia, Torrenegra y colaboradores (2017) en su estudio **“Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*”** observaron que estos aceites inhibieron el crecimiento de diferentes cepas ATCC, entre ellas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, con valores de CMI superiores a 600 mg/mL (10).

En México, Sagaste y colaboradores (2015) en su estudio **“Evaluación de la actividad inhibitoria del aceite esencial de naranja contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*”** presentaron los resultados de pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano a las que sometieron dos tipos de aceites esenciales de una misma especie de naranja Valencia (*Citrus sinensis*) pero de distinta procedencia (Caborca, Sonora, México, y en Redlands, California, EE.UU.), usando el mismo método (hidrodestilación) y en las mismas condiciones. Observaron que el aceite esencial de naranja mexicana presentó un rendimiento casi dos veces más en volumen respecto al aceite esencial de naranja estadounidense. Respecto a la actividad inhibitoria, ambos aceites presentaron un diámetro de inhibición similar frente a *Staphylococcus aureus*; sin embargo, el aceite mexicano presentó actividad frente a *Escherichia coli*, mientras que el aceite estadounidense no fue capaz de inhibir el crecimiento de esta cepa (11).

En Venezuela, Guerra y colaboradores (2014) en su estudio **“Actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus sinensis*) var. Valencia frente a microorganismos grampositivos y gramnegativos”** observaron que, frente a bacterias grampositivas como

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 y gramnegativas tales como *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, el aceite puro no inhibe el crecimiento de las bacterias grampositivas, mientras que frente a las gramnegativas se observó una sensibilidad a partir del 10% (12).

### **2.1.2. Antecedentes nacionales**

En Lima, Luque y Vega (2019) en su tesis **“Actividad antioxidante y efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscara de *Citrus sinensis* variedad Valencia Late”** observaron que, en diluciones del 30, 50 y 70%, dicho aceite esencial presenta efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (13).

En Juliaca, Condori y Vilcazan (2019) en su tesis **“Determinación de capacidad inhibitoria microbiana con aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) y romero (*Rosmarinus officinalis*) en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por el método antibiograma”** observaron que el aceite esencial de naranja produjo un halo de inhibición de 10.94 mm a 11.59 mm frente a *Escherichia coli* y de 9.01 mm a 11.27 mm frente a *Staphylococcus aureus* (14).

En Lima, Juárez y colaboradores (2010) en su estudio “**Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica**” realizaron un ensayo *in vitro* por el método de difusión en agar y formación de halos de inhibición, donde observaron una actividad antibacteriana significativa a concentración del 100% frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25933, no así frente a *Escherichia coli* (15).

## 2.2. BASES TEÓRICAS

### 2.2.1. Naranja

La naranja (*Citrus sinensis* L.) es la especie fruto del árbol de naranjo dulce perteneciente al género *Citrus* y a la familia de las Rutáceas, siendo este hesperidio el más cultivado de todos los cítricos. Su taxonomía y morfología son las siguientes (16):

- División: *Magnoliophyta*
- Clase: *Magnoliopsida*
- Orden: *Sapindales*
- Familia: *Rutaceae*
- Subfamilia: *Aurantioideae*
- Género: *Citrus*
- Especie: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

- Altura: Reducido (6 – 10 m), con ramas poco vigorosas (rosan el suelo) y tronco corto.
- Hojas: Limbo grande, de forma oval y espinas no muy acusadas.
- Flores: También llamadas “azahar”, son ligeramente aromáticas, pueden nacer solas o agrupadas con o sin hojas y con ramas que en ocasiones poseen grandes espinas.
- Fruto: Hesperidio que consta de exocarpio (flavedo o corteza que presenta vesículas que contienen aceite esencial), mesocarpio (albedo de aspecto pomposo y color blanco) y endocarpio (pulpa que presenta sacos con jugo).

Se conocen dos tipos, diferenciados por su sabor: las naranjas dulces y las amargas. Las dulces son las naranjas de mesa de mayor consumo humano, mientras que las amargas no se suelen consumir crudas, siendo empleadas para la preparación de mermeladas y obtención de aceite esencial. Las naranjas dulces se dividen en cuatro grupos o variedades (17) (18):

- ❖ **Grupo Navel**: se debe el nombre por su forma (ombligo, en inglés). Con mucho valor agrícola ya que llegan a crecer robustas, precoces y de gran tamaño. Variedades más destacables: Navelina, Washington Navel y Lanelate.

- ❖ **Grupo Blancas:** es el grupo más significativo de las naranjas dulces. Son la de más larga data, cultivadas globalmente tanto para el mercado en fresco como para la elaboración de zumos gracias a la calidad del fruto, a sus pocas semillas y a su buena capacidad de conservación. Variedades más destacables: Valencia, Pera y Salustiana
- ❖ **Grupo Sanguina:** se debe el nombre por su pigmentación de antocianinas en su flavedo y albedo, que le confiere un color rojo más o menos intenso dependiendo de la variedad y de las condiciones edafo-climáticas. Variedades más destacables: Tarocco y Sanguinelli
- ❖ **Grupo Sucreñas:** Grupo de naranjas dulces que presentan características análogas a las Blancas, aunque con menor acidez. Variedades más destacables: Sucreña e Imperial.

### 2.2.2. Naranja dulce

La naranja dulce variedad Valencia es la más tardía de las variedades, pero a la vez la más importante en el mundo. Su fruto es de tamaño medio a grande, redondo o ligeramente achatado, poca o ninguna semilla, notable coloración a la madurez, cáscara delgada y lisa que tiende a reverdecer al final de temporada. Se puede cosechar desde febrero hasta abril, pero puede permanecer en el árbol hasta junio si las condiciones

de humedad son favorables. Su contenido de jugo es alto y de excelente sabor (16).

El principal uso de la naranja dulce es el consumo humano del jugo, sea fresco o conservado. La pulpa y la corteza obtenidos como subproductos de la extracción de jugo son usados en la elaboración de piensos para animales (18).

En el Perú, la comercialización de la naranja Valencia se concentra en mayor medida (superior al 50%) entre los meses de mayo hasta agosto, iniciando la cosecha en el mes de abril. Entre los departamentos más productores se encuentran Junín (54%), San Martín (14%), Lima (7%), Puno (5%) y Cusco (4%) (19). En Tacna sólo es conocida la producción en el distrito de La Yarada – Los Palos de la variedad Washington Navel (20).

### **2.2.3. Venta ambulante de jugo de naranja**

La venta ambulante de jugo de naranja en la ciudad de Tacna no está muy documentada. No se han hallado registros estadísticos de puestos ambulantes de zumo de naranja ni investigaciones acerca de la utilización de los residuos de cáscara de naranja. Lo poco que se sabe se obtuvo por medio de entrevistas con los mismos vendedores y por medio de la observación de su trabajo.

#### **2.2.4. Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son compuestos terpenoides derivados de la condensación del isopreno. Son de naturaleza lipofílica, aunque no están relacionados con los ácidos grasos. Físicamente, son líquidos a temperatura ambiente, de tonalidades amarillas hasta incoloras, menos densos que el agua, con elevado índice de refracción, insolubles en agua, solubles en alcohol y otros solventes orgánicos. Químicamente, son hidrocarburos (compuestos únicamente por átomos de carbono e hidrógeno), aunque algunos como el del alcanfor contienen funciones oxidadas (átomos de oxígeno) (21). Se producen en las partes verdes (con clorofila) de la planta que al crecer son transportados a otros tejidos donde pueden almacenarse en las diferentes estructuras. Se cree que la función de los aceites esenciales en la planta es atraer insectos polinizadores, así como repeler a los nocivos, o simplemente que son un producto metabólico intermedio (3).

Existen varios métodos para obtener el aceite esencial de una planta:

- ∞ Por expresión
- ∞ Por destilación
- ∞ Por extracción con solventes orgánicos

- ∞ Por enflorado
- ∞ Por maceración

### **2.2.5. Aceites esenciales de cítricos**

Los aceites esenciales de cítricos son insolubles en agua, pero se hacen más solubles cuando se emplean en bajas concentraciones usando etanol como disolvente. En ocasiones, forman soluciones oscuras que se aclaran con dificultad. De aquí que sea deseable eliminar los terpenos y sesquiterpenos. Para ello se pueden aplicar dos métodos: por destilación fraccionada con o sin presión reducida, o la extracción de los compuestos oxigenados más solubles con alcohol diluido y otros disolventes (3).

### **2.2.6. Destilación de aceites esenciales**

El método de destilación consiste en un sistema cerrado en el cual la materia vegetal entra en contacto con el agua o el vapor dentro de una misma caldera que, al hervir, pasa a condensarse en un refrigerante, recogiendo por medio de un alambique el destilado compuesto de agua y aceite.

Puede hacerse con la materia vegetal en contacto directo con el agua (hidrodestilación) o sin contacto directo con el agua (por arrastre de vapor de agua), esto dependerá de la naturaleza de la materia vegetal (22).

El rendimiento del aceite esencial obtenido de una planta varía de acuerdo a la técnica empleada y suele ser desde décimas de porcentaje hasta 1 a 3% del peso vegetal seco (21).

#### **2.2.7. Destilación fraccionada**

La destilación fraccionada es una técnica que se emplea para separar sustancias volátiles cuyos puntos de ebullición difieren entre sí por menos de 25 °C. Esta técnica incorpora una columna de fraccionamiento o rectificación entre la disolución y el refrigerante de un equipo de destilación simple.

La columna de fraccionamiento, también llamada de Vigreux, consta de un tubo largo de vidrio que lleva por dentro puntas o hélices que parten del mismo vidrio de la columna y que funcionan como puntos en los cuales el condensado frío recibe el calor del vapor que asciende y se vuelve a vaporizar parcialmente formando un vapor que enriquecido del componente más volátil. De la misma manera, al ceder calor al condensado, el vapor se enfría formando un condensado aún más rico del componente menos volátil.

Con la columna adecuada y el control suficiente de la temperatura se pueden llegar a separar compuestos volátiles que difieren de pocos grados en su punto de ebullición (23).

### 2.2.8. Cromatografía de gases con detección de masas

La cromatografía de gases es la técnica cromatográfica más empleada para separar compuestos orgánicos volátiles. El método consiste en inyectar una pequeña muestra del material a separar en una corriente de gas inerte (fase móvil) que lo transportará hasta la columna que contiene el medio adecuado para retardar el flujo de los componentes individuales de la muestra. Los componentes de la muestra se irán separando en la columna debido a las diferencias en la adsorción o reparto entre la fase móvil gaseosa y la fase estacionario sólida o líquida. Los compuestos ya separados emergerán a intervalos de tiempo discretos y únicos de cada componente, y pasarán a través de un detector.

La cromatografía de gases se divide en dos tipos:

- **Cromatografía Gas – Sólido (CGS):** donde la fase estacionaria es un sólido y la fase móvil un gas inerte. Esta técnica es muy limitada y sólo es aplicable a compuestos gaseosos de bajo peso molecular.
- **Cromatografía Gas – Líquido (CGL):** donde la fase estacionaria es un líquido retenido sobre la superficie de un soporte sólido y la fase móvil es un gas. En este caso la separación de los compuestos depende de la constante de

solubilidad de la muestra entre la fase líquida y la fase gaseosa. Esta técnica es la más empleada (23).

#### **2.2.9. Limoneno**

El limoneno es el principal compuesto de los aceites esenciales obtenidos de la cáscara de los cítricos. Es un hidrocarburo de la familia de los terpenos, de fórmula  $C_{10}H_{16}$  y nombre 1-metil-4-(1-metiletenil)-ciclohexeno. Físicamente es un líquido incoloro, oleoso, de aroma agradable y poco soluble en agua. Posee un punto de ebullición de 176 °C a 1 atm de presión. Es ampliamente utilizado como precursor de productos químicos para la industria farmacéutica, alimentaria y de polímeros. Comercialmente, es un subproducto del procesamiento de los cítricos, siendo un producto natural, abundante y muy barato (4).

#### **2.2.10. *Escherichia coli***

Es una especie de bacteria gramnegativa del tipo de bacilos flagelados. Su hábitat natural es el tracto gastrointestinal de los mamíferos donde forma parte de la flora bacteriana, sin embargo, puede llegar a desarrollarse en otros órganos y causar severas infecciones. Las cepas de *E. coli* patógenas son causa importante de enfermedad diarreica aguda (EDA) que se en mayor medida en menores de 5 años y que constituye una de las causas más importantes de mortalidad infantil (14).

### **2.2.11. *Staphylococcus aureus***

Es una especie de bacteria grampositiva del tipo de cocos que forman racimos. Sus principales hábitats en mamíferos son las fosas nasales, la piel y tracto gastrointestinal que en ocasiones llega a desarrollar un amplio espectro de enfermedades que van desde infecciones simples de la piel hasta infecciones sistémicas que ponen en riesgo la vida del huésped y en muchos casos resistente a múltiples antibióticos, sobre todo a la meticilina (14).

### **2.2.12. Método de Kirby-Bauer o de difusión de disco**

El método de Kirby-Bauer, también llamado de difusión de disco en placa, es el método recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Este método consiste en colocar en la superficie de agar de una placa Petri, previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con diferentes concentraciones de antimicrobiano. En cuanto el disco impregnado se deposita en la superficie del agar, el filtro absorbe agua y el antimicrobiano difunde al agar. El antimicrobiano difunde radialmente a través del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Tras un tiempo

de incubación, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición, también llamado halo de inhibición (24).

#### **2.2.13. Concentración mínima inhibitoria (CMI)**

Se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en  $\mu\text{g/mL}$ ) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo a las 24 horas de incubación a 37 °C. La CMI se considera como patrón de referencia frente a otros métodos que evalúan la susceptibilidad antimicrobiana, además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando los resultados obtenidos por otros métodos son indeterminados (25).

#### **2.2.14. Concentración mínima bactericida (CMB)**

Se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (por lo general, 24 horas) (25).

#### **2.2.15. Prueba estadística F de análisis de varianza (ANOVA)**

Esta prueba se utilizó para determinar si existe una diferencia significativa entre las medias y las varianzas de tres o más grupos (26).

En la prueba F se compara si existe diferencia entre una variable métrica-nominal entre tres o más opciones. Las fórmulas a utilizar fueron varias (ver Resultados).

### **2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

#### **Venta ambulante**

Actividad comercial de venta al por menor realizada generalmente en lugares públicos sin establecimiento comercial permanente que utiliza instalaciones desmontables, transportables o móviles (27).

#### **Hesperidio**

Fruto carnoso de corteza gruesa, dividido en varias celdas por telillas membranosas; p. ej., la naranja y el limón (28).

#### **Flavedo**

Estructura más externa del fruto de los cítricos, llamado también cáscara. En él se encuentran las glándulas de aceites esenciales producidas por los frutos. Es grueso y puede ser más o menos liso o rugoso (18).

#### **Albedo**

Estructura intermedia del fruto de los cítricos, localizada entre el flavedo y la pulpa. Es una capa más o menos gruesa, de color blanco con alto contenido de pectinas (18).

**Hidrolato**

Es el agua residual que se forma durante el proceso de obtención de un aceite esencial por destilación por arrastre de vapor (29).

**Cepa**

Grupo de microorganismos, como bacterias o virus, que pertenecen a la misma especie y comparten ciertas características que no se encuentran en otros miembros de la especie (30).

**Halo (de inhibición)**

Zona de distribución radial que es producida por la difusión de un agente antimicrobiano sobre una placa de agar inoculada con algún microorganismo. Está expresada por el diámetro en milímetros (mm) (24).

## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **3.1. TIPO, DISEÑO Y NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN**

##### **3.1.1. Tipo y diseño de la investigación**

###### **Según la intervención del investigador**

El estudio es de tipo **Experimental** porque la variable dependiente se ve alterada cuando se manipula la variable independiente.

###### **Según la planificación de la toma de datos**

El estudio es de tipo **Prospectivo** porque son observadas las variables durante un corto periodo de tiempo para recopilar información y registrar resultados.

###### **Según el número de ocasiones en que mide la variable de estudio**

El estudio es de tipo **Transversal** porque se analizan los datos de las variables compilados dentro de un corto periodo de tiempo.

###### **Según el número de variables de interés**

El estudio es de tipo **Analítico** porque se plantean y se ponen a prueba las hipótesis.

### **3.1.2. Nivel de la investigación**

El nivel de investigación es **Exploratorio** porque se centra en analizar e investigar aspectos concretos de la realidad que no han sido explorados en profundidad.

## **3.2. POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO**

### **3.2.1. Población**

Residuos de cáscara de naranja producto de la venta ambulante de jugo de naranja en la ciudad de Tacna.

### **3.2.2. Muestra**

Residuos de cáscara de naranja obtenido de 5 puestos de venta ambulante de jugo de naranja en el Mercado Mayorista Grau de Tacna.

### **3.2.3. Muestreo**

Aleatorio.

## **3.3. MATERIALES E INSTRUMENTOS**

### **3.3.1. Materiales**

- |                             |       |
|-----------------------------|-------|
| ▪ Tijera para podar de 8"   | 1     |
| ▪ Papel Kraft (pliego)      | 40    |
| ▪ Papel de aluminio (rollo) | 1     |
| ▪ Algodón                   | 500 g |

▪ Bowl de acero inoxidable grande	2
▪ Guantes de nitrilo color negro talla M (caja x 50 unidades)	1
▪ Guantes de cuero termorresistente (par)	1
▪ Soporte universal	3
▪ Pinza de tres dedos con nuez doble	2
▪ Aro metálico	1
▪ Conector de vidrio doblado	1
▪ Condensador de Graham	1
▪ Mangueras de plástico de 0.5 cm de diámetro (metro)	2
▪ Balde de plástico de 20 L	1
▪ Pera de decantación de 250 mL	1
▪ Vaso Beaker de vidrio de 200	4
▪ Vaso Beaker de vidrio de 250 mL	1
▪ Probeta de vidrio graduada de 25 mL	1
▪ Probeta de vidrio graduada de 100 mL	1
▪ Probeta de vidrio graduada de 500 mL	1
▪ Piseta de laboratorio	1
▪ Matraz Erlenmeyer de 100 mL	7
▪ Matraz Erlenmeyer de 125 mL	1
▪ Matraz Erlenmeyer de 250 mL	5
▪ Matraz Erlenmeyer de 500 mL	4
▪ Matraz Erlenmeyer de 600 mL	1

▪ Pipeta de vidrio de 10 mL	2
▪ Tubo de ensayo de 15 x 125 mm	20
▪ Tubo de ensayo de 13 x 100 mm	30
▪ Gradilla para tubos de ensayo	2
▪ Placa Petri de 10 x 100 mm	40
▪ Frascos viales con tapa de jebe	10
▪ Asa de Kolle	2
▪ Asa de Digrafski	2
▪ Mechero de alcohol	8
▪ Frasco de vidrio color ámbar de 10 mL	2
▪ Frasco de vidrio color ámbar de 120 mL	3
▪ Gotero de vidrio	2

### **3.3.2. Equipos e instrumentos**

▪ Deshidratador de alimentos marca Blackline HB-327B	2
▪ Equipo de destilación por arrastre con vapor	1
▪ Equipo de destilación fraccionada de 250 mL marca Glassco	1
▪ Estufa eléctrica marca Brüder	1
▪ Balanza electrónica Henkel (0.01 – 1000 g)	1
▪ Mechero de Bunsen	1
▪ Bomba de agua BKL-750	1
▪ Multímetro digital marca Uni-T UT33C+ con termocupla	1
▪ Autoclave marca GCA modelo 67018	1

▪ Incubadora marca MEMMERT modelo DIL-12880-KI	1
▪ Balanza analítica marca KERN modelo AES-2004C	1
▪ Balanza de precisión marca KERN modelo PBS6200-2M	1
▪ Propipeta de 10 mL	1
▪ Micropipeta Brand Transferpette S 0 – 10 µL	1
▪ Micropipeta Brand Transferpette S 10 – 100 µL	1
▪ Micropipeta Brand Transferpette S 100 – 1000 µL	1
▪ Vernier digital Truper de 6"	1
▪ Agitador Vortex VWR VM-300 minivortexer	1

### 3.3.3. Insumos y reactivos

▪ Cáscara de naranja fresca	20 kg
▪ Hielo en escamas (cubetas de 10 L)	20
▪ Cloruro de calcio en escamas	10 g
▪ Etanol de 96° (litro)	1
▪ Metanol	5 mL
▪ Alcohol isopropílico	5 mL
▪ Ron de quemar (litro)	2
▪ Tintura de yodo (gotero)	1
▪ Dimetilsulfóxido 10%	40 mL
▪ Discos de sensibilidad de ceftazidima Oxoid de 30 ug	200
▪ Puntas para micropipetas de 0 – 10 µL	100
▪ Puntas para micropipetas de 10 – 100 µL	100

▪ Puntas para micropipetas de 100 – 1000 $\mu$ L	100
▪ Cepa KwikStik de <i>S. aureus</i> ATCC 6538	1
▪ Cepa KwikStik de <i>E. coli</i> ATCC 8720	1
▪ Nefelómetro de Mac Farland ( $1,5 \times 10^8$ cel/mL)	1
▪ Agar Nutritivo marca Liofilchem	30 g
▪ Agar Müller-Hinton marca Liofilchem	100 g
▪ Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) marca Liofilchem	50 g

### 3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### 3.4.1. Recolección de muestras de residuos de cáscara de naranja

Los vendedores ambulantes poseen un carro pequeño (ver Anexo 1) con cajones en la parte inferior donde almacenan las naranjas previamente lavadas. Estas naranjas las compran en puestos de venta al por mayor (en el caso del Mercado Mayorista Grau, las adquieren en las fruterías ubicadas en la parte exterior) y que, según los mismos vendedores, proceden de distintas haciendas del centro y norte del país tales como Pacífico, Palma, Santa Cristina y Selva, siendo las principales las de Chanchamayo, Junín; todas ellas productoras de una misma variedad, la naranja Valencia (ver Anexo 2 y 3).

En promedio, una naranja Valencia madura mide de 9 a 10 cm de diámetro; tiene un color anaranjado claro con algunas

motas de verde que indican la madurez del fruto (ver Anexo 4); posee de 4 a 6 semillas; su cáscara es delgada, lisa, dura, difícil de pelar con las manos y de un suave aroma cítrico.

Encima del mesón, los vendedores disponen de un pelador manual similar a un torno (ver Anexo 6), en el cual colocan la naranja entera sujeta por sus polos, ajustan la cuchilla sobre la piel de la naranja y hacen girar la manivela, pelando muy fácil y en cuestión de segundos la cáscara. De esta forma, al exprimir las rodajas se obtiene un jugo dulce y fresco, sin el sabor amargo del aceite esencial que se encuentra en ella y que, en caso de no pelarlas, se extrae por expresión y se mezcla con el jugo.

Las cáscaras de naranja suelen tener un ancho de aproximadamente 1 cm y de 2.8 a 3 m de largo (ver Anexo 7). Los vendedores siempre suelen tener listas naranjas peladas que almacenan en un envase de vidrio encima del mesón, mientras que la cáscara la cuelgan a un lado del carro. Así, al final de la jornada, logran juntar kilos de tiras de cáscara fresca de naranja, las cuales venden al precio simbólico de S/.1.00 (\$0.27 USD) sin pesar la cantidad, sólo estimando por el tamaño del rollo de tiras de cáscara (ver Anexo 8).

Las muestras fueron recolectadas de diversos puestos ambulantes de venta de jugo de naranja dentro del Mercado

Mayorista Grau (ver Anexos 9, 10 y 11), de forma aleatoria y en distintos días del mes de mayo. En total fueron necesarios 10 días de recolección.

#### **3.4.2. Tratamiento de las muestras**

Las muestras, una vez recolectadas, fueron extendidas para poderlas cortar (ver Anexo 12). No fue considerado necesario lavar las muestras debido a que de todas formas cualquier impureza física es eliminada en la destilación, además de que iba a retardar mucho más el proceso de secado.

Con la ayuda de tijeras para podar se cortó la cáscara fresca en tiras de aproximadamente 30 cm para así poder disponerlas en forma circular en las bandejas de deshidratación (ver Anexo 13). Por cada bandeja se programó un tiempo de secado de 20 horas seguidas a 40 °C. Se utilizó dos deshidratadores de alimentos que funcionaban a la vez debido a que muchas veces la cantidad recolectada sobrepasaba la capacidad de las bandejas (ver Anexo 14). Cuando esto pasaba, la cáscara que sobraba era almacenada en refrigeración a 8 °C hasta desocupar las bandejas y poderlas procesar.

Como resultado se obtuvo tiras de cáscara seca de consistencia frágil, sin signos de oxidación ni descomposición, de fuerte aroma y buen color (ver Anexo 15). Para finalizar el

tratamiento, cada muestra seca era colocada en un bowl grande en el cual se trizaba con las manos hasta obtener tiras pequeñas de aproximadamente 2 cm de largo (ver Anexo 16). El bowl era tapado con papel aluminio y almacenado para ser usado posteriormente en la extracción el aceite esencial.

### **3.4.3. Certificación de la especie de naranja**

La certificación estuvo a cargo del biólogo Dr. Pablo Franco León, a quien se le hizo entrega de una muestra de la naranja que se emplea en la venta ambulante de jugo y se le hizo saber todos los datos correspondientes a su comercialización y procedencia. El doctor tuvo por bien emitir el certificado que acredita la especie y variedad de naranja de la siguiente manera (ver Anexo 17):

- ∞ División: MAGNOLIOPHYTA
- ∞ Clase: MAGNOLIOPSIDA
- ∞ Orden: SAPINDALES
- ∞ Familia: RUTACEA
- ∞ Género: *Citrus*
- ∞ Especie: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck variedad Valencia
- ∞ Nombre común: Naranja dulce

#### **3.4.4. Extracción del aceite esencial por arrastre de vapor de agua**

En la mesa del Laboratorio de Farmacobotánica de la Escuela de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna se armó un equipo de extracción por arrastre de vapor de la siguiente manera (ver Anexo 18): una olla a presión con una sola salida (cuya boca fue reforzada con cinta de teflón y debajo de la cual se colocó un mechero de Bunsen conectado a un balón de gas ubicado debajo de la mesa), dentro de la cual se colocó una canastilla de acero inoxidable que se posaba sobre una gradilla que mantenía sin contacto el agua de la canastilla con la muestra previamente pesada (ver Anexos 19 y 20). La tapa de la olla se conectó a través de un tubo de vidrio doblado a medida a un condensador de Graham (por el cual se hacía circular agua fría cuya fuente estaba en un balde con agua con una cubeta de hielo que había que cambiar al finalizar cada extracción (ver Anexo 21) y en la cual estaba sumergida una bomba de agua que la hacía circular por medio de una manguera y recircular a través de otra al mismo balde (ver Anexo 22)) y en cuyo extremo se colocó un matraz Erlenmeyer de 600 mL que recogía el destilado para ser trasvasado a una pera de decantación de 250 mL que permitía separar el hidrolato del aceite (el hidrolato

separado cada vez era desechado mientras que el aceite se dejaba en la pera para que se integre al nuevo destilado que estaba en curso) (ver Anexo 23).

Al finalizar cada día de extracción, el aceite recolectado era trasvasado a una probeta de 25 mL en la cual se medía el volumen de aceite, se le añadía unas escamas de cloruro de calcio para que absorba el agua (ver Anexo 24), se tapaba con papel aluminio y se dejaba reposar hasta la mañana siguiente en donde se trasvasaba a una probeta de 250 mL.

Se realizaron entre 2 a 4 extracciones por día, cada una con una duración aproximada de 1,5 horas (contada a partir de la primera hasta la última gota de destilado en el matraz). Detalles como el peso de la muestra, la hora de inicio y final, el aceite obtenido y el rendimiento de cada extracción eran registrados en la bitácora de la tesis (ver Anexo 25).

Luego de 20 extracciones y de haber procesado más de 6 kilos de cáscara deshidratada, se obtuvieron 192 mL de aceite esencial de cáscara de naranja (ver Anexo 26) y se determinó el rendimiento de acuerdo a fórmula (ver Resultados).

El aceite esencial fue envasado en un frasco de vidrio ámbar de 200 mL y refrigerado a 5 °C para ser usado posteriormente en la destilación fraccionada de limoneno.

### **3.4.5. Obtención de limoneno por destilación fraccionada del aceite esencial**

Con meses de anticipación, se hizo la compra de un equipo de destilación fraccionada marca Glassco de 250 mL, el cual consta de una columna Vigreux de 320 mm, un refrigerante recto de 250 mm, un balón de fondo redonde de 250 mL, cabezal para destilación, adaptador para termómetro, colector acodado, termómetro de varilla (-10/+110 °C) y pinzas keck para los esmerilados (ver Anexo 27).

En la mesa del Laboratorio de Farmacobotánica de la Escuela de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna se armó el equipo de destilación fraccionada, del cual se tuvo que cambiar el termómetro de varilla por una termocupla acoplada a un multímetro digital que registraba en tiempo real la temperatura en un rango mayor que el de los termómetros clásicos (ver Anexo 28). Para este equipo se utilizó el mismo sistema de refrigeración que el de la extracción del aceite esencial.

En el matraz redondo se colocaron 150 mL del aceite esencial (los 42 mL restantes fueron conservados en refrigeración), se encendió el mechero y se llevó a ebullición.

Cerca de los 150 °C hubo una fracción de al menos 10 mL que se destiló pero que fue desechada por no ser de interés. A partir de los 170 hasta los 176 °C fue recolectada una fracción de aproximadamente 110 mL, tomando un tiempo de aproximadamente 2 horas (ver Anexo 29).

Considerando que, según la bibliografía, el limoneno tiene un punto de ebullición de 178 °C a 1 atmósfera de presión, y que la ciudad de Tacna presenta menos presión atmosférica, se decidió realizar una segunda destilación fraccionada pero esta vez a la fracción recolectada. Se volvió a destilar y se recolectó entre los 175 y 176 °C (ver Anexo 30) cerca de 90 mL de fracción destilada que fue envasada en un frasco ámbar de 100 mL y conservada en refrigeración a 5 °C.

#### **3.4.6. Análisis cromatográfico de gases con detección de masas de la fracción destilada**

Con ayuda de un gotero, se colocó en un tubo de ensayo con tapa hermética 1 mL de la última fracción destilada. Se rotuló con los datos pertinentes, se envolvió en papel aluminio y, junto a dos gel-pack congelados, se empaquetó en una caja pequeña para luego ser embalada y rotulada (ver Anexo 31). Se dejó el paquete con la muestra en una agencia courier con destino al Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad

Católica de Santa María de Arequipa, cuyo remitente fue el jefe del laboratorio Mgr. Ricardo Abril, quien realizó el servicio de análisis cromatográfico de gases con detección de masas de la muestra y remitió a los 7 días los resultados del análisis.

El informe del análisis de la muestra por cromatografía de gases con detección de masas llevado a cabo en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa entre los días 13 y 19 de junio se pueden observar en Resultados.

#### **3.4.7. Caracterización fisicoquímica del limoneno**

Una vez obtenidos los resultados del análisis cromatográfico, se realizaron en el Laboratorio de Microbiología los ensayos de determinación de algunas propiedades fisicoquímicas de interés (31):

##### **3.4.7.1. Densidad**

En la balanza analítica se pesó una probeta de vidrio de 5 mL vacía junto con una punta de micropipeta de 1 mL y se tararon juntas su masa. Luego, se tomó la punta, se la colocó en la micropipeta, se tomaron 1000  $\mu$ L de limoneno y se vertieron en la probeta, expulsando la punta y dejándola encima de la probeta, tal cual fueron taradas (ver

Anexo 32). Así se pudo determinar la densidad del limoneno de acuerdo a fórmula (ver Resultados).

#### **3.4.7.2. Solubilidad en metanol**

En un tubo de ensayo se colocaron 500  $\mu\text{L}$  de limoneno, se le añadió 500  $\mu\text{L}$  de metanol y se colocó sobre el agitador Vortex por 10 segundos (ver Anexo 33 y 34). Se observó la formación de una emulsión blanca que al reposar revelaba dos fases inmiscibles. Se le agregaron 500  $\mu\text{L}$  más de metanol y se agitó de la misma manera. Se observó la formación de una emulsión blanca que se mantenía en el reposo (ver Anexo 35). Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  más de metanol, se agitó y se observó una solución homogénea translúcida, lo cual indicó la completa disolución del limoneno en metanol.

#### **3.4.7.3. Solubilidad en etanol 96°**

En un tubo de ensayo se colocaron 500  $\mu\text{L}$  de limoneno, se le añadió 500  $\mu\text{L}$  de etanol 96° y se colocó sobre el agitador Vortex por 10 segundos. Se observó la formación de una emulsión blanca que se mantenía en el reposo. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  más de etanol 96°, se agitó y se observó una solución homogénea translúcida, lo cual indicó la completa disolución del limoneno en etanol.

#### **3.4.7.4. Solubilidad en isopropanol**

En un tubo de ensayo se colocaron 500  $\mu\text{L}$  de limoneno, se le añadió 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol y se colocó sobre el agitador Vortex por 10 segundos. Se observó una solución homogénea traslúcida. Se repitió desde cero el proceso, pero esta vez añadiendo en un tubo 250  $\mu\text{L}$  y en otro 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se agitaron y se observó lo mismo, lo cual indicó la completa disolución del limoneno en isopropanol a cualquier proporción.

#### **3.4.8. Ensayo *in vitro* de la actividad antibacteriana del limoneno**

El ensayo *in vitro* fue realizado en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, con la asesoría del Blgo. Edwin Obando, quien es el administrador a cargo de dicho laboratorio, y basado en métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos (32).

Los procedimientos detallados a continuación se realizaron de una misma forma para ambas cepas *Escherichia coli* (ATCC 8720) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Por lo tanto, y para simplificar las cosas, no se especificarán las bacterias en cada procedimiento, mas sí se hará lo propio en los Resultados.

En cada día de trabajo realizado dentro del laboratorio de Microbiología se tomaron las medidas respectivas de asepsia y desinfección de superficies (con alcohol yodado), así como del uso de equipo de protección personal (mascarilla, cofia, guantes y bata) (ver Anexo 36) y mecheros de alcohol. Cabe resaltar que todo el material de vidrio y de metal empleado (placas, viales, pipetas, vasos, pinzas, etc.) fue previamente lavado con agua destilada y puesto a secar envuelto en papel Kraft en una estufa a 180 °C por 2 horas para dejarlo libre de impurezas.

Se realizó la preparación de los medios de cultivo tales como caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI), agar Müeller Hinton (MH) y agar Nutritivo (AN) (ver Anexo 37) días antes de haber realizado el ensayo.

En el caso de la preparación del caldo BHI, siguiendo las instrucciones y cálculos, se pesaron 7,4 g para obtener 20 tubos con 10 mL de caldo cada uno (ver Anexo 38).

En el caso de la preparación del agar Müeller Hinton, siguiendo las instrucciones y cálculos, se pesaron 36,48 g para obtener 960 mL de agar (450 mL para cada una de las cepas y 60 mL para los controles) (ver Anexo 39), los cuales fueron vertidos a cálculo manual en 64 placas Petri (aproximadamente 15 mL en cada placa) (ver Anexo 40).

En el caso de la preparación del agar Nutritivo, siguiendo las instrucciones y cálculos, se pesaron 1,96 g para obtener 70 mL de agar, los cuales fueron vertidos a cálculo manual en 10 viales (aproximadamente 7 mL en cada vial) (ver Anexo 41).

Los viales, junto con las placas y los tubos de ensayo con los medios de cultivo fueron forrados con papel Kraft, rotulados y esterilizados en la autoclave por 15 minutos a 121 °C y 15 libras de presión (ver Anexos 42 y 43). Luego de esto, fueron conservados en refrigeración a 5 °C a la espera de ser usados.

#### **3.4.8.1. Preparación bacteriana del inóculo (Técnica de De Paula y Martins, 2000)**

Las cepas bacterianas que se usaron ya estaban previamente activadas en un vial con agar nutritivo y refrigeradas debido a que ya se había realizado trabajos anteriormente con estas cepas ATCC (ver Anexo 44).

La preparación bacteriana del inóculo consta de 3 pasos, los cuales están en relación con las fases del ciclo biológico de las bacterias ya que cada una de estos pasos se realizan en una determinada fase del ciclo:

- ✓ **Primer paso (en fase cero):** Para la preparación de la suspensión del inóculo del agente bacteriano de prueba, se tomaron asadas del cultivo y se

suspendieron (ver Anexo 45) en dos tubos de ensayo con caldo BHI (uno por cada cepa), para luego ser llevados a incubación por 24 horas a  $35\pm 2$  °C (ver Anexo 46).

- ✓ **Segundo paso (en fase de latencia):** Al día siguiente, se tomaron asadas de la suspensión de cada agente bacteriano y se sembraron por estría y agotamiento (ver Anexo 47) en dos viales con agar Nutritivo (uno por cada cepa), para luego ser llevados de nuevo a incubación por 24 horas a  $35\pm 2$  °C.
- ✓ **Tercer paso (en fase exponencial):** Al día siguiente, se tomaron asadas del cultivo anterior y se suspendieron en dos tubos de ensayo con caldo BHI (uno por cada cepa), para luego ser llevados por última vez a incubación por 2 horas a  $35\pm 2$  °C (ver Anexo 48). Pasado el tiempo, y con ayuda del Nefelómetro de McFarland, se añadió 1 mL de caldo BHI hasta alcanzar la turbidez de tubo 0,5 de la escala de McFarland que indica una concentración de  $1,5 \times 10^8$  cel/mL (ver Anexo 49).

El nefelómetro de McFarland empleado consta de un tubo de ensayo con una mezcla de  $\text{BaCl}_2$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  cuya

turbidez está estandarizada para dar una concentración de  $1,5 \times 10^8$  cel/mL de una suspensión bacteriana. Por ende, si se comparan e igualan la turbidez de ambas suspensiones frente a un fondo contrastable, se supondrá que la suspensión bacteriana posee la misma concentración de células por mililitro.

#### **3.4.8.2. Preparación de los discos de sensibilidad**

Para la realización del ensayo sólo se pudo conseguir discos de inhibición de ceftazidima de 30  $\mu$ L y no discos en blanco. Sin embargo, esto no fue un impedimento, ya que sólo había que inactivar el antibiótico para obtener los discos en blanco.

Se colocaron 186 discos de sensibilidad (93 por cada cepa: 90 para las diluciones de limoneno y 3 negativos) en un Beaker de 1 L y se le añadió 200 mL de agua destilada. Se agitó, se forró en papel Kraft y se llevó a esterilizar en la autoclave por 15 minutos a 121 °C y 15 libras de presión. Luego de esto, con ayuda de una pinza se distribuyeron todos los discos por las paredes del vaso (ver Anexo 50) y se colocó en la estufa por 2 horas a 180 °C.

### 3.4.8.3. Preparación de los discos de sensibilidad con limoneno

Los controles positivos fueron los discos no inactivados con ceftazidima y los controles negativos fueron los discos inactivados sin alguna dilución de limoneno.

Cada disco de sensibilidad tiene una capacidad de 30  $\mu\text{L}$ . Cada porcentaje de limoneno va a utilizar 9 discos por cepa, es decir, 18 discos en total. Por ende, por cada porcentaje se debió preparar por lo menos 540  $\mu\text{L}$ . El solvente empleado para la dilución del limoneno fue el dimetilsulfóxido al 10%. Se prepararon 10 viales con 540  $\mu\text{L}$  de cada concentración según la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Cantidades a mezclar para la preparación de las diluciones de limoneno a distintas concentraciones.

[ ] (%v/v)	DMSO al 10% ( $\mu\text{L}$ )	Limoneno ( $\mu\text{L}$ )	[ ] mg/mL
10%	486	54	84,22
20%	432	108	168,44
30%	378	162	252,66
40%	324	216	336,88
50%	270	270	421,1
60%	216	324	505,32
70%	162	378	589,54
80%	108	432	673,76
90%	54	486	757,98
100%	0	540	842,2

*Fuente: Elaboración propia.*

Los discos inactivados se colocaron en placas Petri vacías divididos por porcentajes y se les impregnó uno a uno con una micropipeta los 30  $\mu$ L de su respectiva dilución (ver Anexo 51).

#### **3.4.8.4. Determinación del halo de inhibición por el método Kirby-Bauer (Técnica Duraffourd y col, 1983)**

Una vez listas las placas con agar Müller Hinton, los discos de sensibilidad con limoneno y luego de haber pasado 2 horas del tercer paso de la preparación del inóculo, se procede a realizar la siembra y colocación de los discos de sensibilidad en las placas.

Para ello, primero se etiquetó cada placa con su concentración y cepa bacteriana. La técnica empleada fue la siembra por diseminación en superficie. En cada placa, el procedimiento fue verter 100  $\mu$ L de la suspensión bacteriana que, con ayuda del asa de Digrafski, se extendió por toda la superficie del agar, esterilizando en alcohol y fuego la asa tras usarlo en una placa (ver Anexos 52 y 53).

Con las placas listas, se procedió a colocar con pinzas 3 discos de sensibilidad por cada placa según su respectiva concentración, distribuidos de forma triangular sobre la superficie del agar, esterilizando en alcohol y

fuego las pinzas tras usarlas en una placa (ver Anexo 54). Finalmente, se volvieron a forrar las placas y se llevaron a incubación por 24 horas a  $35\pm 2$  °C.

Al día siguiente, se procedió a medir con un vernier digital los halos de inhibición producidos por cada disco y se anotó cada dato en la bitácora (ver Anexo 55). Se observó que los controles positivos y negativos fueron exitosos para ambas cepas, produciendo los positivos un halo de inhibición notable en el caso de *S. aureus* (ver Resultados) y ningún halo en el caso de *E. coli*, mientras que los negativos no produjeron ningún halo de inhibición (ver Anexos 56 y 57).

#### **3.4.8.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Técnica de Granados y Villaverde, 1997)**

Para llevar a cabo la determinación de la concentración mínima inhibitoria primero se tuvieron que obtener los resultados de los halos de inhibición, ya que la CMI debe determinarse tomando un rango más pequeño entre las concentraciones que produjeron un halo de inhibición mayor a 14 mm. Ninguno de los halos de inhibición del ensayo (excepto los controles positivos de *S. aureus*) llegó a tal diámetro. Sin embargo, se optó por

realizar de todos modos la determinación de la CMI ya que forma parte de la evaluación de la actividad *in vitro* de un antimicrobiano.

Se volvieron a preparar las suspensiones bacterianas por 3 días. Una vez listos, se prepararon 24 tubos de ensayos (12 para cada cepa: 10 con diluciones de limoneno, 1 control positivo y 1 control negativo) con las cantidades indicadas (ver Anexo 58). En el caso de *E. coli*, se trabajó dentro del rango de 10 a 100%, mientras que para *S. aureus* el rango fue de 1 a 10%, según las siguientes tablas:

**Tabla 2.** Cantidades a mezclar para la preparación de los tubos de ensayo para la determinación de la CMI frente a *E. coli* con limoneno a distintas concentraciones.

[ ] (%v/v)	[ ] mg/mL	Volúmenes (µL)			Susp. bact.
		Caldo BHI	DMSO al 10%	Limoneno	
10%	84,22	2520	171	9	300
20%	168,44	2520	162	18	300
30%	252,66	2520	153	27	300
40%	336,88	2520	144	36	300
50%	421,1	2520	135	45	300
60%	505,32	2520	126	54	300
70%	589,54	2520	117	63	300
80%	673,76	2520	108	72	300
90%	757,98	2520	99	81	300
100%	842,2	2520	90	90	300
<b>Control +</b>		2520	90	0	90
<b>Control -</b>		2520	90	90	0

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 3.** Cantidades a mezclar para la preparación de los tubos de ensayo para la determinación de la CMI frente a *S. aureus* con limoneno a distintas concentraciones.

[ ] (%v/v)	[ ] mg/mL	Volúmenes (µL)			Susp. bact.
		Caldo BHI	DMSO al 10%	Limoneno	
10%	84,22	2520	171	9	300
20%	168,44	2520	162	18	300
30%	252,66	2520	153	27	300
40%	336,88	2520	144	36	300
50%	421,1	2520	135	45	300
60%	505,32	2520	126	54	300
70%	589,54	2520	117	63	300
80%	673,76	2520	108	72	300
90%	757,98	2520	99	81	300
100%	842,2	2520	90	90	300
<b>Control +</b>		2520	90	0	90
<b>Control -</b>		2520	90	90	0

Fuente: Elaboración propia.

#### 3.4.8.6. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

Para la determinación de la concentración mínima bactericida es necesario que no haya habido crecimiento visible (es decir, que se haya perdido la turbidez) en al menos un tubo en el ensayo de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). En este caso, se observó que todos los tubos con diluciones de cada cepa no perdieron su turbidez, es decir, no inhibieron el crecimiento de las bacterias (ver Resultados y Anexo 59 y

60). Por todo esto, no se determinó la concentración mínima bactericida.

### **3.5. TÉCNICA DE ANÁLISIS DE DATOS**

En el presente trabajo de investigación se analizaron los datos manualmente y se organizaron en el software Microsoft Excel. Para el análisis estadístico se utilizó la técnica de análisis de varianza (ANOVA), usando la prueba F de Fisher con niveles de significación de 0,05 y 0,01.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1. Rendimiento del aceite esencial de cáscara de naranja

Se determinó el rendimiento por medio de la suma de todos los volúmenes de aceite extraídos sobre la suma de todos los pesos de muestra de cáscara deshidratada. Se obtuvo un rendimiento de extracción promedio de 2,7% según la fórmula:

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{V_{\text{aceite}}}{P_{\text{muestra}}} \times 100 \quad (1)$$


$$\text{Rendimiento \%} = \frac{192 \text{ mL}}{7133.1 \text{ g}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Rendimiento \%} \approx 2,7\% \quad (3)$$

#### 4.2. Análisis cromatográfico de gases con detección de masas


Los resultados emitidos por el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa del ensayo de análisis cromatográfico de gases con detección de masas realizado a la muestra de la fracción destilada a 175 °C del aceite esencial de cáscara de naranja afirman que dicha muestra se compone en un 100% de limoneno:

**Figura 1. Página 1/2 del informe de ensayo.**



**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS**  
**LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD**

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166  
 ✉ laboratorioensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350  
 AREQUIPA - PERÚ



---

**INFORME DE ENSAYO N° ANA13F24.005335**

**INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE**

**Nombre del cliente** : Enzo Javier Montoya Carita  
**Dirección del cliente** : Asoc. Promuvi Villa Inclán Mz. 86 Lt. 01  
**RUC** : No declara  
**Identificación del contacto** : Enzo Javier Montoya Carita  
**Descripción de la muestra** : Aceite esencial de naranja


**INFORMACIÓN DEL ENSAYO**

**Condición del muestreo** : Por el cliente  
**Tamaño de muestra** : 1 mL  
**Fecha de recepción** : 13/06/2024  
**Fecha de ejecución de ensayo** : 13/06/2024 al 19/06/2024  
**Fecha de emisión de informe** : 21/06/2024  
**Página** : 1 de 2

---


**I. ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO:**

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS (DENOMINACION NIST)	D-Limoneno
DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE PESTICIDAS (%) CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS, MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN, POR NORMALIZACIÓN INTERNA (ÁREA)	D-Limoneno (100%)




Código: LECC-15INF-002F ED 01 Fecha de Aprobación: 2022-08-16 Aprobación por: DT

Figura 2. Página 2/2 del informe de ensayo.



**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS**  
**LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD**

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 + 51 54 382038 ANEXO 1166  
 laboratorioensayo@ucsm.edu.pe http://www.ucsm.edu.pe Apto. 1350  
 AREQUIPA - PERÚ



---

**INFORME DE ENSAYO N° ANA13F24.005335**

---

**INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE**

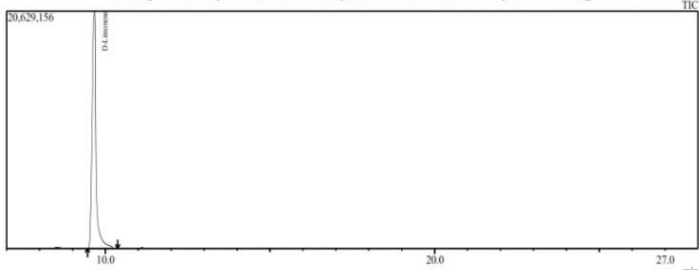
**Nombre del cliente** : Enzo Javier Montoya Carita  
**Dirección del cliente** : Asoc. Promuvi Villa Inclán Mz. 86 Lt. 01  
**RUC** : No declara  
**Identificación del contacto** : Enzo Javier Montoya Carita  
**Descripción de la muestra** : Aceite esencial de naranja

**INFORMACIÓN DEL ENSAYO**

**Condición del muestreo** : Por el cliente  
**Tamaño de muestra** : 1 mL  
**Fecha de recepción** : 13/06/2024  
**Fecha de ejecución de ensayo** : 13/06/2024 al 19/06/2024  
**Fecha de emisión de informe** : 21/06/2024  
**Página** : 2 de 2

---


Chromatogram aceite naranja C:\GCMSolution\Data\Project\muestras control 2024\aceite naranja frac b 17-06-24.qgd




Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	9.673	9.455	10.375	174849158	100.00	20617512	100.00	8.48	SV	D-Limonene

**OBSERVACIONES:**

- La información proporcionada por el cliente es de responsabilidad exclusiva del mismo.
- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento previo y transporte de la muestra hasta el ingreso al LECC son responsabilidad del solicitante y los resultados emitidos en el presente informe se refieren a la muestra tal como se recibió.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



F. Ricardo A. Abril Ramírez  
 CGFDA 00424  
 ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC



Código: LECC-15INF-002F ED 01 Fecha de Aprobación: 2022-08-16 Aprobación por: DT

### 4.3. Densidad del limoneno

La densidad del limoneno fue determinada por la siguiente fórmula:

$$\rho = \frac{m}{v} \quad (4)$$

Donde:

- $\rho$ : densidad
- m: masa
- v: volumen

Entonces:

$$\rho = \frac{842,2 \text{ mg}}{1000 \text{ }\mu\text{L}} \quad (5)$$

$$\rho = \frac{842,2 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} \quad (6)$$

$$\rho = 842,2 \text{ mg/mL} \quad (7)$$

A 20°C, el limoneno presentó una densidad de 842,2 mg/mL.

### 4.4. Solubilidad del limoneno en metanol

A 20 °C, el limoneno presentó una solubilidad en metanol de 1:3.

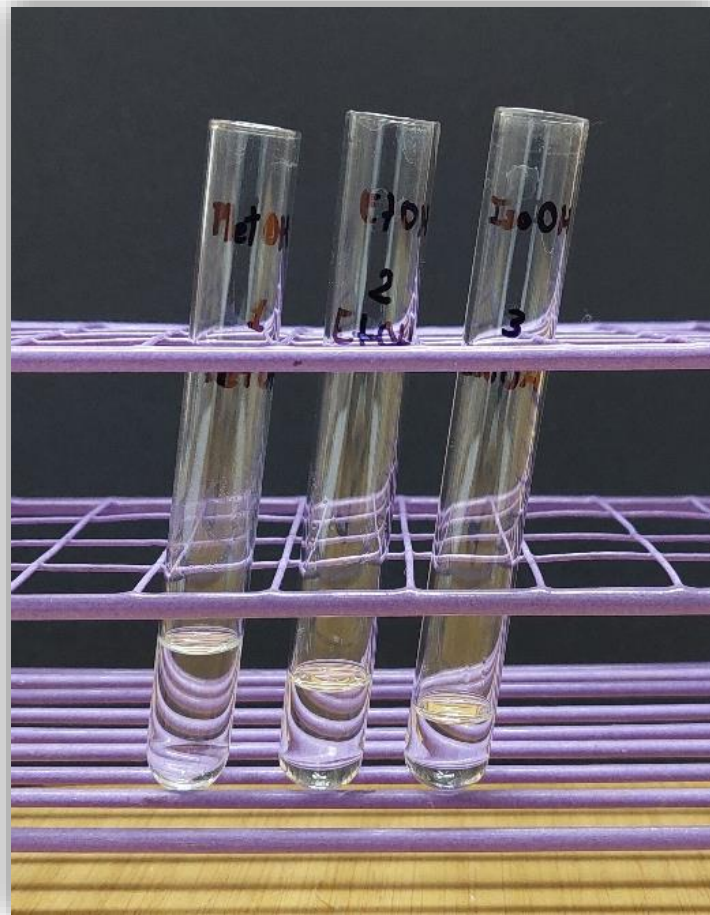
### 4.5. Solubilidad del limoneno en etanol 96°

A 20 °C, el limoneno presenta una solubilidad en etanol de 1:2.

### 4.6. Solubilidad del limoneno en isopropanol

A 20°C, el limoneno es completamente soluble en isopropanol a cualquier proporción.

**Figura 3.** Ensayo de solubilidad del limoneno en metanol (izquierda),  
etanol (centro) e isopropanol (derecha).



#### 4.7. Halos de inhibición del limoneno frente a *Escherichia coli*

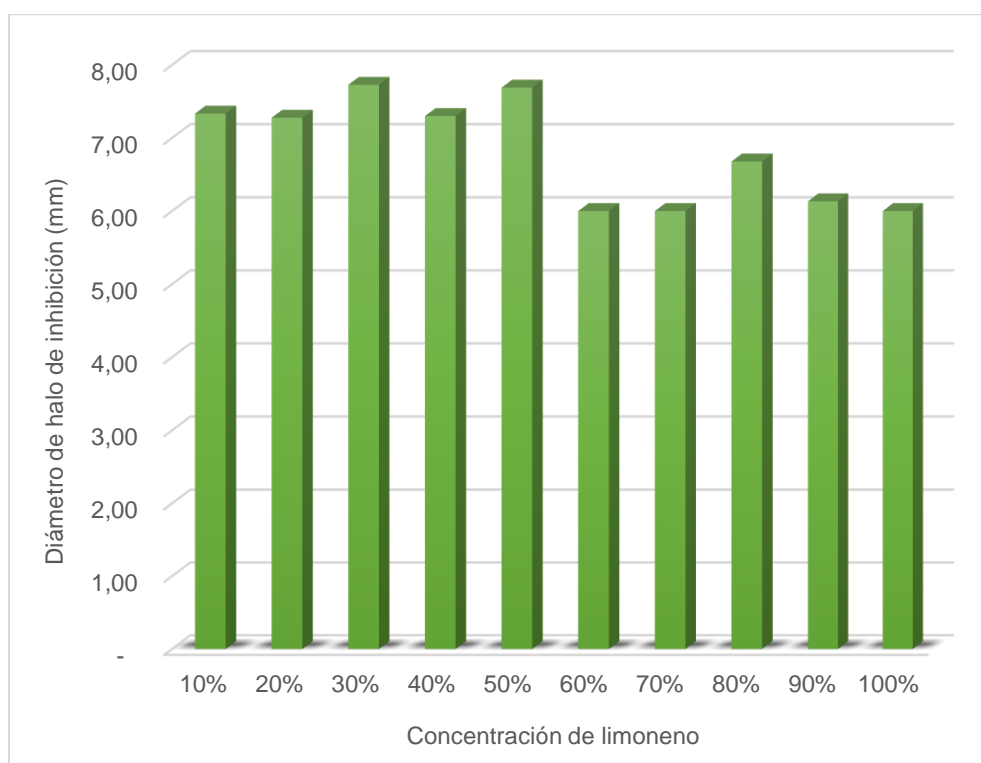
**Tabla 4.** Halos de inhibición del limoneno frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.

Concentración de limoneno		Discos de sensibilidad y sus halos de inhibición (mm)									Promedio
		Placa 1			Placa 2			Placa 3			
[ ] (%v/v)	[ ] mg/mL	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>6</sub>	D <sub>7</sub>	D <sub>8</sub>	D <sub>9</sub>	
10%	84,22	7,3	7,8	7,2	7	7	7	7,5	8	7,2	7,33
20%	168,44	7,3	7,3	7,5	7,8	7,4	7,3	7,9	6,5	6,5	7,28
30%	252,66	8	7,95	8,1	7,6	7,4	7,4	7,9	7,6	7,6	7,73
40%	336,88	7	7	7	7,6	8,1	8	6,5	6,5	8	7,3
50%	421,1	7,5	7,4	7,3	8,4	8,3	7,7	8,4	7,2	7	7,69
60%	505,32	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
70%	589,54	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
80%	673,76	6	6	7,1	6	8,4	7,5	6	6	7,1	6,68
90%	757,98	6	6	6	6	6	6	6	6	7,2	6,13
100%	842,2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Control (+)		6	6	6	-	-	-	-	-	-	6

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 4 se presentan los promedios de los halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones de limoneno frente a *E. coli* mediante el método de difusión de disco (Kirby-Bauer). Los resultados obtenidos indican un mayor promedio de halo de inhibición a la concentración de 30% con 7,73 mm mientras que con la menor concentración de 10% se obtuvo un halo de inhibición 7,33 mm.

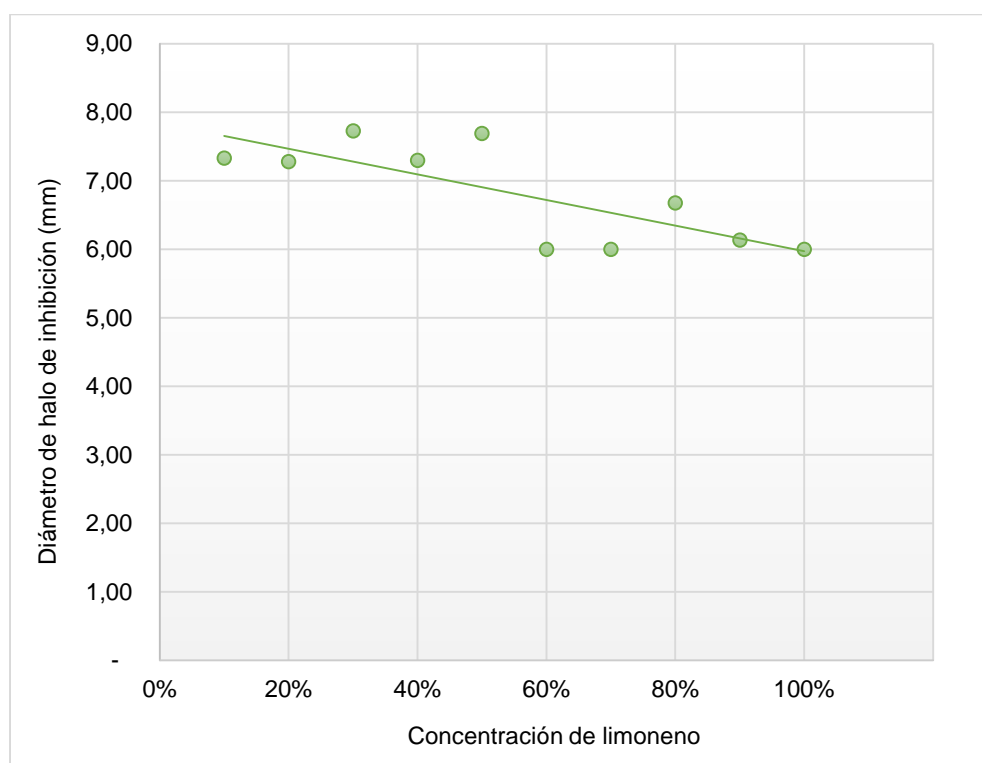
**Figura 4.** Distribución de promedios de los halos de inhibición del limoneno frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.



Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 4 se presentan los promedios de halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones del limoneno frente a *E. coli*. Se observa una tendencia a tener un mayor halo de inhibición cuando las concentraciones son mínimas. En este sentido, puede notarse que las concentraciones de 30 y 50% poseen el primer y segundo lugar con 7,73 y 7,69 mm respectivamente.

**Figura 5.** Dispersión de promedios y correlación lineal de los halos de inhibición del limoneno frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.



Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 5 se presenta la dispersión de promedios y la correlación lineal de los halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones del limoneno frente a *E. coli*. Se observa un coeficiente de correlación de -1 (negativo) lo cual indica que el crecimiento de la concentración se asocia con el descenso del diámetro del halo de inhibición.

#### 4.8. Halos de inhibición del limoneno frente a *Staphylococcus aureus*

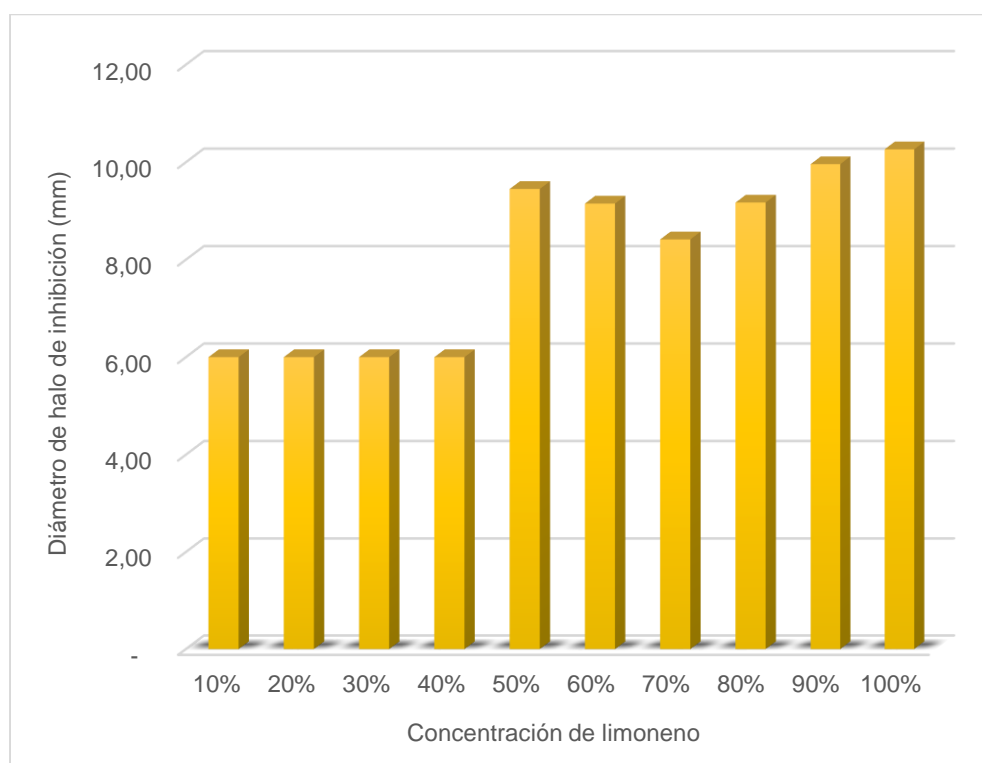
**Tabla 5.** Halos de inhibición del limoneno frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Concentración de limoneno		Discos de sensibilidad y sus halos de inhibición (mm)									Promedio
		Placa 1			Placa 2			Placa 3			
[ ] (%v/v)	[ ] mg/mL	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>6</sub>	D <sub>7</sub>	D <sub>8</sub>	D <sub>9</sub>	
10%	84,22	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
20%	168,44	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
30%	252,66	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
40%	336,88	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
50%	421,1	9,23	9,23	9,67	10,3	9,29	9,39	9,12	9,12	9,7	9,45
60%	505,32	8,59	8	8,3	10,2	8,42	8,91	11,38	9,28	9,28	9,15
70%	589,54	9,19	8,88	9,97	8,26	9,64	9,22	7,37	6,7	6,5	8,41
80%	673,76	9,37	9,77	8,36	10,57	8,85	8,03	9,325	9,745	8,52	9,17
90%	757,98	9,3	9,87	9,125	9,875	10,6	10,33	10	10,56	9,97	9,96
100%	842,2	11,55	10,38	9,66	10,39	9,7	10	10,77	9,88	10,03	10,26
Control (+)		16,38	16,6	15,6	-	-	-	-	-	-	16,19

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 5 se presentan los promedios de los halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones de limoneno frente a *S. aureus* mediante el método de difusión de disco (Kirby-Bauer). Los resultados obtenidos indican un mayor promedio de halo de inhibición con la concentración de 100% con 10,26 mm.

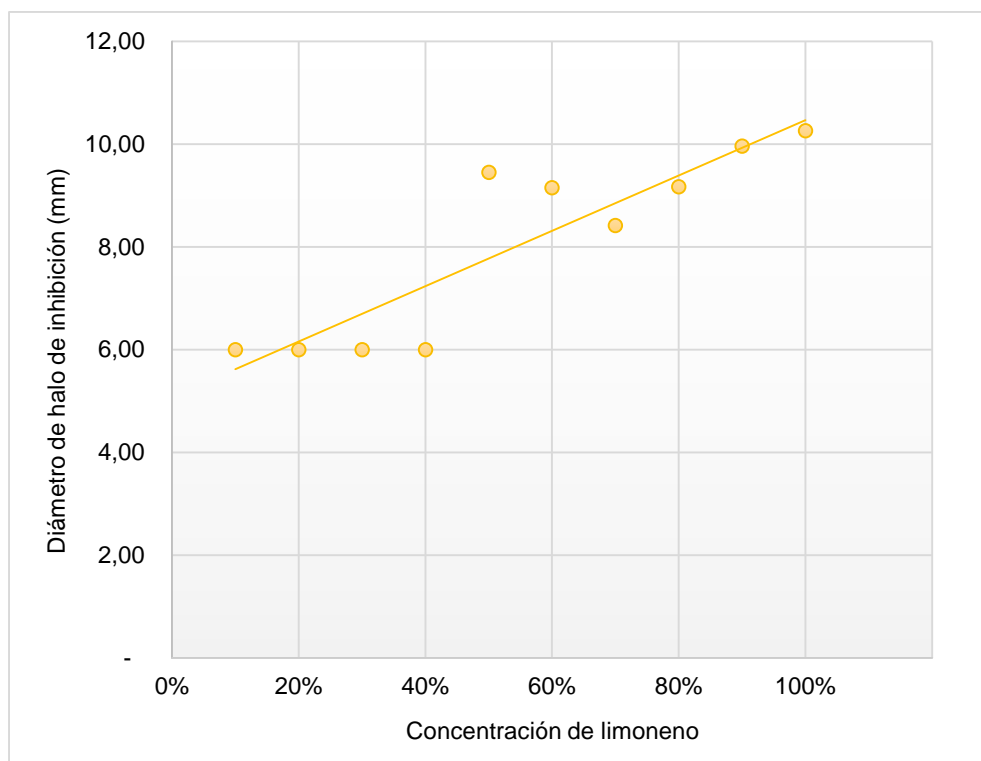
**Figura 6.** Distribución de promedios de los halos de inhibición del limoneno frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.



Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 6 se presentan los promedios de halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones del limoneno frente a *S. aureus* ATCC 6538. Se observa una tendencia a tener un mayor halo de inhibición cuando las concentraciones son máximas. En este sentido, puede notarse que las dos concentraciones mayores de 90 y 100% poseen el segundo y primer lugar con 9,96 y 10,26 mm respectivamente.

**Figura 7.** Dispersión de promedios y correlación lineal de los halos de inhibición del limoneno frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.



Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 7 se presenta la dispersión de promedios y la correlación lineal de los halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones del limoneno frente a *S. aureus*. Se observa un coeficiente de correlación de +1 (positivo) lo cual indica que el crecimiento de la concentración se asocia con el crecimiento del diámetro del halo de inhibición.

#### 4.9. Concentración mínima inhibitoria del limoneno frente a *Escherichia coli*

**Tabla 6.** Prueba de la concentración mínima inhibitoria del limoneno frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.

[ ] (%v/v)	[ ] mg/mL	Turbidez
10%	84,22	+
20%	168,44	+
30%	252,66	+
40%	336,88	+
50%	421,1	+
60%	505,32	+
70%	589,54	+
80%	673,76	+
90%	757,98	+
100%	842,2	+
<b>Control (+)</b>		+
<b>Control (-)</b>		-

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 6 se observa que, con excepción del control negativo al cual no se le añadió bacterias, todas las concentraciones presentaron turbidez, lo cual indica que el limoneno en cualquier concentración no inhibió el crecimiento bacteriano de *E. coli*.

#### 4.10. Concentración mínima inhibitoria del limoneno frente a *Staphylococcus aureus*

**Tabla 7.** Prueba de la concentración mínima inhibitoria del limoneno frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

[ ] (%v/v)	[ ] mg/mL	Turbidez
1%	84,22	+
2%	16,84	+
3%	25,26	+
4%	33,68	+
5%	42,11	+
6%	50,53	+
7%	58,95	+
8%	67,37	+
9%	75,8	+
10%	84,22	+
<b>Control (+)</b>		+
<b>Control (-)</b>		-

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 7 se observa que, con excepción del control negativo al cual no se le añadió bacterias, todas las concentraciones presentaron turbidez, lo cual indica que el limoneno en cualquier concentración no inhibió el crecimiento bacteriano de *S. aureus*.

#### 4.11. Prueba estadística F de análisis de varianza (ANOVA)

Cálculo de la media total de los halos de inhibición tomando los promedios de cada concentración de limoneno frente a *Escherichia coli* ATCC 8720:

**Tabla 8.** Media total ( $\bar{x}$ ) de los halos de inhibición del limoneno frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.

Concentración de limoneno		Promedio de halos de inhibición (mm)
[ ] (%v/v)	[ ] mg/mL	
10%	84,22	7,33
20%	168,44	7,28
30%	252,66	7,73
40%	336,88	7,3
50%	421,1	7,69
60%	505,32	6
70%	589,54	6
80%	673,76	6,68
90%	757,98	6,13
100%	842,2	6
<b>Media total =</b>		<b>6,814</b>

Fuente: Elaboración propia.

Cálculo de la media total de los halos de inhibición tomando los promedios de cada concentración de limoneno frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538:

**Tabla 9.** Media total ( $\bar{x}$ ) de los halos de inhibición del limoneno frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Concentración de limoneno		Promedio de halos de inhibición (mm)
[ ] (%v/v)	[ ] mg/mL	
10%	84,22	6
20%	168,44	6
30%	252,66	6
40%	336,88	6
50%	421,1	9,45
60%	505,32	9,15
70%	589,54	8,41
80%	673,76	9,17
90%	757,98	9,96
100%	842,2	10,26
<b>Media total =</b>		<b>8,04</b>

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 10.** Suma total de cuadrados (STC) con los cuadrados de la diferencia entre la media total (6,814) y el halo de inhibición de cada disco de limoneno frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.

$(D_x - \bar{x})^2$									
[ ] (%v/v)	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>6</sub>	D <sub>7</sub>	D <sub>8</sub>	D <sub>9</sub>
10%	0.236196	0.972196	0.148996	0.034596	0.034596	0.034596	0.470596	1.406596	0.148996
20%	0.236196	0.236196	0.470596	0.972196	0.343396	0.236196	1.179396	0.098596	0.098596
30%	1.406596	1.290496	1.653796	0.617796	0.343396	0.343396	1.179396	0.617796	0.617796
40%	0.034596	0.034596	0.034596	0.617796	1.653796	1.406596	0.098596	0.098596	1.406596
50%	0.470596	0.343396	0.236196	2.515396	2.208196	0.784996	2.515396	0.148996	0.034596
60%	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596
70%	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596
80%	0.662596	0.662596	0.081796	0.662596	2.515396	0.470596	0.662596	0.662596	0.081796
90%	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.148996
100%	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596	0.662596
<b>Suma total de cuadrados (STC) =</b>									<b>59,87514</b>

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 11.** Suma total de cuadrados (STC) con los cuadrados de la diferencia entre la media total (8,04) y el halo de inhibición de cada disco de limoneno frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

$(D_x - \bar{x})^2$									
[ ] (%v/v)	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>6</sub>	D <sub>7</sub>	D <sub>8</sub>	D <sub>9</sub>
10%	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616
20%	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616
30%	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616
40%	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616	4.1616
50%	1.4161	1.4161	2.6569	5.1076	1.5625	1.8225	1.1664	1.1664	2.7556
60%	0.3025	0.0016	0.0676	4.6656	0.1444	0.7569	11.1556	1.5376	1.5376
70%	1.3225	0.7056	1.93	0.0484	2.56	1.3924	0.4489	1.7956	2.3716
80%	1.7689	2.9929	0.1024	6.4009	0.6561	0.0001	1.651225	2.907025	0.2304
90%	1.5876	3.3489	1.177225	3.367225	6.5536	5.2441	3.8416	6.3504	3.7249
100%	12.3201	5.4756	2.6244	5.5225	2.7556	3.8416	7.4529	3.3856	3.9601
<b>Suma total de cuadrados (STC) =</b>									<b>300,876</b>

Fuente: Elaboración propia.

Cálculo de los grados de libertad (GL) para ambas cepas:

$$GL = (m \times n) - 1 \quad (8)$$

Donde:

- GL: grados de libertad
- m: número de grupos
- n: número de datos por grupo

Entonces:

$$GL = (10 \times 9) - 1 \quad (9)$$

$$GL = 89 \quad (10)$$

Fórmula para el cálculo de la varianza (V):

$$V = \frac{STC}{GL} \quad (11)$$

Donde:

- V: varianza
- STC: suma total de cuadrados
- GL: grado de libertad

Cálculo de la varianza (V) de los halos de inhibición del limoneno frente a *Escherichia coli* ATCC 8720:

$$V = \frac{302,6704}{89} \quad (12)$$

$$V = 3,400791 \quad (13)$$

Cálculo de la varianza (V) de los halos de inhibición del limoneno frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538:

$$V = \frac{358,437654}{89} \quad (14)$$

$$V = 4,027389 \quad (15)$$

**Tabla 12.** Suma total de cuadrados dentro de cada grupo (SCD) con los cuadrados de la diferencia entre el promedio de cada concentración y el halo de inhibición de cada disco de limoneno frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.

[ ] (%v/v)	$(D_x - P)^2$									Promedio (P)
	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>6</sub>	D <sub>7</sub>	D <sub>8</sub>	D <sub>9</sub>	
10%	0,0009	0,2209	0,0169	0,1089	0,1089	0,1089	0,0289	0,4489	0,0169	7,33
20%	0,0004	0,0004	0,0484	0,2704	0,0144	0,0004	0,3844	0,6084	0,6084	7,28
30%	0,0729	0,0484	0,1369	0,0169	0,1089	0,1089	0,0289	0,0169	0,0169	7,73
40%	0,09	0,09	0,09	0,09	0,64	0,49	0,64	0,64	0,49	7,3
50%	0,0361	0,0841	0,1521	0,5041	0,3721	0,0001	0,5041	0,2401	0,4761	7,69
60%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
70%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
80%	0,4624	0,4624	0,1764	0,4624	2,9584	0,6724	0,4624	0,4624	0,1764	6,68
90%	0,0169	0,0169	0,0169	0,0169	0,0169	0,0169	0,0169	0,0169	1,1449	6,13
100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
<b>Suma total de cuadrados dentro de cada grupo (STC) =</b>										<b>16,7559</b>

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 13.** Suma total de cuadrados dentro de cada grupo (SCD) con los cuadrados de la diferencia entre el promedio de cada concentración y el halo de inhibición de cada disco de limoneno frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

[ ] (%v/v)	$(D_x - P)^2$									Promedio (P)
	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>6</sub>	D <sub>7</sub>	D <sub>8</sub>	D <sub>9</sub>	
10%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
20%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
30%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
40%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
50%	0,0484	0,0484	0,0484	0,7225	0,0256	0,0036	0,1089	0,1089	0,0625	9,45
60%	8,59	8	8,3	10,2	8,42	8,91	11,38	9,28	9,28	9,15
70%	9,19	8,88	9,97	8,26	9,64	9,22	7,37	6,7	6,5	8,41
80%	9,37	9,77	8,36	10,57	8,85	8,03	9,325	9,745	8,52	9,17
90%	9,3	9,87	9,125	9,875	10,6	10,33	10	10,56	9,97	9,96
100%	11,55	10,38	9,66	10,39	9,7	10	10,77	9,88	10,03	10,26
<b>Suma total de cuadrados dentro de cada grupo (STC) =</b>										<b>31,4182</b>

Fuente: Elaboración propia.

Cálculo de los grados de libertad dentro de cada grupo (GLD) para ambas cepas:

$$GLD = m \times (n - 1) \quad (16)$$

Donde:

- GLD: grados de libertad dentro de cada grupo
- m: número de grupos
- n: número de datos por grupo

Entonces:

$$GLD = 10 \times (9 - 1) \quad (17)$$

$$GLD = 80 \quad (18)$$

**Tabla 14.** Suma total de cuadrados entre cada grupo (SCE) con los cuadrados del número de datos por grupo multiplicado por la diferencia entre la media total (6,814) y el promedio de cada concentración de cada disco de limoneno frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.

[ ] (%v/v)	Promedio (P)	$n \times (P - \bar{x})^2$
10%	7,33	2,396304
20%	7,28	1,954404
30%	7,73	7,551504
40%	7,3	2,125764
50%	7,69	6,906384
60%	6	5,963364
70%	6	5,963364
80%	6,68	0,161604
90%	6,13	4,210704
100%	6	5,963364
<b>Suma total de cuadrados entre cada grupo (SCE) =</b>		<b>43,19676</b>

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 15.** Suma total de cuadrados entre cada grupo (SCE) con los cuadrados del número de datos por grupo multiplicado por la diferencia entre la media total (8,04) y el promedio de cada concentración de cada disco de limoneno frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

[ ] (%v/v)	Promedio (P)	$n \times (P - \bar{x})^2$
10%	6	37,4544
20%	6	37,4544
30%	6	37,4544
40%	6	37,4544
50%	9,45	17,8929
60%	9,15	11,0889
70%	8,41	1,2321
80%	9,17	11,4921
90%	9,96	33,1776
100%	10,26	44,3556
<b>Suma total de cuadrados entre cada grupo (SCE) =</b>		<b>269,0568</b>

Fuente: Elaboración propia.

Cálculo de los grados de libertad entre cada grupo (GLE) para ambas cepas:

$$GLE = m - 1 \quad (19)$$

Donde:

- GLE: grados de libertad entre cada grupo
- m: número de grupos

Entonces:

$$GLE = 10 - 1 \quad (20)$$

$$GLE = 9 \quad (21)$$

**Tabla 16.** Resumen de los cálculos obtenidos del desarrollo de la prueba estadística F.

Cepa	Suma total de cuadrados (STC)	Grados de libertad (GL)	Suma total de cuadrados dentro de cada grupo (SCD)	Grados de libertad dentro de cada grupo (GLD)	Suma total de cuadrados entre cada grupo (SCE)	Grados de libertad entre cada grupo (GLE)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8720	59,87514		16,67838		43,19676	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	300,876	89	31.8192	80	269,0568	9

Fuente: Elaboración propia.

Se plantean las siguientes hipótesis:

- ☞ Hipótesis nula ( $H_0$ ): La concentración no produce una variación en el diámetro los halos de inhibición.

$$\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_{10} \quad (22)$$

- ☞ Hipótesis alternativa ( $H_1$ ): La concentración sí produce una variación en el diámetro los halos de inhibición.

$$\mu_1 \neq \mu_2 \neq \dots \neq \mu_{10} \quad (23)$$

Se asume que la hipótesis nula ( $H_0$ ) es verdadera. Se emplea la prueba estadística F:

$$F = \frac{\frac{SCE}{GLE}}{\frac{SCD}{GLD}} \quad (24)$$

Figura 8. Tabla de valores críticos de la distribución F ( $\alpha = 0,05$ ).

g.d.l		f 0,05														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	243,0	243,9	244,7	245,4	245,9	1
2	18,513	19,000	19,164	19,247	19,296	19,330	19,353	19,371	19,385	19,396	19,405	19,413	19,419	19,424	19,429	2
3	10,128	9,552	9,277	9,117	9,013	8,941	8,887	8,845	8,812	8,786	8,763	8,745	8,729	8,715	8,703	3
4	7,709	6,944	6,591	6,388	6,256	6,163	6,094	6,041	5,999	5,964	5,936	5,912	5,891	5,873	5,858	4
5	6,608	5,786	5,409	5,192	5,050	4,950	4,876	4,818	4,772	4,735	4,704	4,678	4,655	4,636	4,619	5
6	5,987	5,143	4,757	4,534	4,387	4,284	4,207	4,147	4,099	4,060	4,027	4,000	3,976	3,956	3,938	6
7	5,591	4,737	4,347	4,120	3,972	3,866	3,787	3,726	3,677	3,637	3,603	3,575	3,550	3,529	3,511	7
8	5,318	4,459	4,066	3,838	3,687	3,581	3,500	3,438	3,388	3,347	3,313	3,284	3,259	3,237	3,218	8
9	5,117	4,256	3,863	3,635	3,482	3,374	3,293	3,231	3,179	3,137	3,102	3,073	3,048	3,025	3,006	9
10	4,965	4,103	3,708	3,478	3,326	3,217	3,135	3,072	3,020	2,978	2,943	2,913	2,887	2,865	2,845	10
11	4,844	3,982	3,587	3,357	3,204	3,095	3,012	2,948	2,896	2,854	2,818	2,788	2,761	2,739	2,719	11
12	4,747	3,885	3,490	3,259	3,106	2,996	2,913	2,849	2,796	2,754	2,717	2,687	2,660	2,637	2,617	12
13	4,667	3,806	3,411	3,179	3,025	2,915	2,832	2,767	2,714	2,671	2,635	2,604	2,577	2,554	2,533	13
14	4,600	3,739	3,344	3,112	2,958	2,848	2,764	2,699	2,646	2,602	2,565	2,534	2,507	2,484	2,463	14
15	4,543	3,682	3,287	3,056	2,901	2,790	2,707	2,641	2,588	2,544	2,507	2,475	2,448	2,424	2,403	15
16	4,494	3,634	3,239	3,007	2,852	2,741	2,657	2,591	2,538	2,494	2,456	2,425	2,397	2,373	2,352	16
17	4,451	3,592	3,197	2,965	2,810	2,699	2,614	2,548	2,494	2,450	2,411	2,381	2,353	2,329	2,308	17
18	4,414	3,555	3,160	2,928	2,773	2,661	2,577	2,510	2,456	2,412	2,374	2,342	2,314	2,290	2,269	18
19	4,381	3,522	3,127	2,895	2,740	2,628	2,544	2,477	2,423	2,378	2,340	2,308	2,280	2,256	2,234	19
20	4,351	3,493	3,098	2,866	2,711	2,599	2,514	2,447	2,393	2,348	2,310	2,278	2,250	2,225	2,203	20
21	4,325	3,467	3,072	2,840	2,685	2,573	2,488	2,420	2,366	2,321	2,283	2,250	2,222	2,197	2,176	21
22	4,301	3,443	3,048	2,817	2,662	2,550	2,465	2,397	2,342	2,297	2,259	2,226	2,198	2,173	2,151	22
23	4,279	3,422	3,027	2,796	2,641	2,528	2,442	2,374	2,320	2,275	2,236	2,204	2,175	2,150	2,128	23
24	4,260	3,403	3,008	2,776	2,621	2,508	2,422	2,354	2,299	2,254	2,215	2,183	2,155	2,130	2,108	24
25	4,242	3,385	2,990	2,759	2,603	2,490	2,405	2,337	2,282	2,236	2,198	2,165	2,136	2,111	2,089	25
26	4,225	3,369	2,975	2,743	2,587	2,474	2,388	2,321	2,265	2,220	2,181	2,148	2,119	2,094	2,072	26
27	4,210	3,354	2,960	2,728	2,572	2,459	2,373	2,305	2,250	2,204	2,166	2,132	2,103	2,078	2,056	27
28	4,196	3,340	2,947	2,715	2,559	2,445	2,359	2,291	2,236	2,190	2,151	2,118	2,089	2,064	2,041	28
29	4,183	3,328	2,934	2,701	2,545	2,432	2,346	2,278	2,223	2,177	2,138	2,104	2,075	2,050	2,027	29
30	4,171	3,316	2,922	2,690	2,534	2,421	2,334	2,266	2,211	2,165	2,126	2,092	2,063	2,037	2,015	30
31	4,160	3,305	2,911	2,679	2,523	2,409	2,323	2,255	2,199	2,153	2,114	2,080	2,051	2,026	2,003	31
32	4,149	3,295	2,901	2,668	2,512	2,398	2,311	2,244	2,188	2,142	2,103	2,070	2,040	2,015	1,992	32
33	4,139	3,285	2,892	2,659	2,503	2,389	2,303	2,236	2,179	2,133	2,094	2,060	2,030	2,004	1,982	33
34	4,130	3,276	2,883	2,650	2,494	2,380	2,294	2,227	2,170	2,123	2,084	2,050	2,021	1,995	1,972	34
35	4,121	3,267	2,874	2,641	2,485	2,371	2,285	2,217	2,161	2,114	2,075	2,041	2,012	1,986	1,963	35
40	4,085	3,232	2,839	2,606	2,449	2,336	2,249	2,180	2,124	2,077	2,038	2,003	1,974	1,948	1,924	40
60	4,001	3,150	2,758	2,525	2,368	2,254	2,167	2,097	2,040	1,993	1,952	1,917	1,887	1,860	1,836	60
80	3,960	3,111	2,719	2,486	2,329	2,214	2,126	2,056	1,999	1,951	1,910	1,875	1,845	1,817	1,793	80
90	3,947	3,098	2,706	2,473	2,316	2,201	2,113	2,043	1,986	1,938	1,897	1,861	1,830	1,803	1,779	90
100	3,936	3,087	2,696	2,463	2,306	2,191	2,103	2,032	1,975	1,927	1,886	1,850	1,819	1,792	1,768	100
120	3,920	3,072	2,680	2,447	2,290	2,175	2,087	2,016	1,959	1,910	1,869	1,834	1,803	1,775	1,750	120
inf.	3,841	2,996	2,605	2,372	2,214	2,099	2,010	1,938	1,880	1,831	1,789	1,752	1,720	1,692	1,666	inf.

Fuente: <https://mat.udu.cl/hsalinas/cursos/2008/probabilidad/TablaF05.pdf>

Figura 9. Tabla de valores críticos de la distribución F ( $\alpha = 0,01$ ).

Grados de libertad del Denominador		Grados de libertad del Numerador														
g.d.l.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	g.d.l.
1	4,052,2	4,999,5	5,403,4	5,624,6	5,763,6	5,859,0	5,928,4	5,981,1	6,022,5	6,055,8	6,083,3	6,106,3	6,125,9	6,142,7	6,157,3	1
2	98,503	99,000	99,166	99,249	99,333	99,399	99,456	99,504	99,545	99,581	99,613	99,641	99,665	99,686	99,704	2
3	34,116	30,817	29,457	28,710	28,237	27,911	27,672	27,489	27,345	27,229	27,133	27,052	26,983	26,924	26,872	3
4	21,198	18,000	16,694	15,977	15,522	15,207	14,976	14,799	14,659	14,546	14,452	14,374	14,307	14,249	14,198	4
5	16,258	13,274	12,060	11,392	10,967	10,672	10,456	10,289	10,158	10,051	9,963	9,888	9,825	9,770	9,722	5
6	13,745	10,925	9,780	9,148	8,746	8,466	8,260	8,102	7,976	7,874	7,790	7,718	7,657	7,605	7,559	6
7	12,246	9,547	8,451	7,847	7,460	7,191	6,993	6,840	6,719	6,620	6,538	6,469	6,410	6,359	6,314	7
8	11,259	8,649	7,591	7,006	6,632	6,371	6,178	6,029	5,911	5,814	5,734	5,667	5,609	5,559	5,515	8
9	10,561	8,022	6,992	6,422	6,057	5,802	5,603	5,457	5,331	5,237	5,158	5,111	5,055	5,005	4,962	9
10	10,044	7,559	6,552	5,994	5,636	5,386	5,200	5,057	4,942	4,849	4,772	4,706	4,650	4,601	4,558	10
11	9,646	7,206	6,217	5,668	5,316	5,068	4,886	4,744	4,632	4,539	4,462	4,397	4,342	4,293	4,251	11
12	9,330	6,927	5,953	5,412	5,064	4,821	4,640	4,499	4,388	4,296	4,220	4,155	4,100	4,052	4,010	12
13	9,074	6,701	5,739	5,205	4,862	4,620	4,441	4,300	4,189	4,100	4,025	3,960	3,905	3,857	3,815	13
14	8,862	6,515	5,564	5,035	4,695	4,456	4,278	4,140	4,030	3,943	3,868	3,803	3,748	3,698	3,656	14
15	8,683	6,359	5,417	4,893	4,558	4,321	4,142	4,004	3,895	3,808	3,733	3,666	3,612	3,564	3,522	15
16	8,531	6,226	5,292	4,773	4,443	4,207	4,026	3,889	3,780	3,693	3,618	3,551	3,498	3,451	3,409	16
17	8,400	6,112	5,185	4,669	4,336	4,102	3,927	3,791	3,682	3,595	3,519	3,452	3,400	3,353	3,312	17
18	8,285	6,013	5,092	4,579	4,248	4,015	3,841	3,705	3,597	3,510	3,434	3,367	3,316	3,269	3,227	18
19	8,185	5,926	5,010	4,500	4,171	3,939	3,765	3,631	3,523	3,436	3,360	3,293	3,242	3,195	3,153	19
20	8,096	5,849	4,938	4,431	4,103	3,871	3,699	3,564	3,457	3,370	3,294	3,227	3,177	3,130	3,088	20
21	8,017	5,780	4,874	4,369	4,042	3,812	3,640	3,505	3,398	3,311	3,235	3,168	3,119	3,072	3,030	21
22	7,945	5,719	4,817	4,313	3,988	3,758	3,587	3,452	3,345	3,258	3,182	3,115	3,067	3,019	2,978	22
23	7,881	5,664	4,765	4,262	3,939	3,710	3,539	3,404	3,297	3,211	3,135	3,068	3,020	2,973	2,931	23
24	7,823	5,614	4,718	4,216	3,895	3,667	3,496	3,361	3,254	3,168	3,092	3,025	2,977	2,930	2,889	24
25	7,770	5,568	4,675	4,177	3,855	3,627	3,457	3,324	3,217	3,131	3,055	2,988	2,940	2,893	2,850	25
26	7,721	5,526	4,637	4,140	3,818	3,591	3,421	3,288	3,182	3,096	3,020	2,953	2,905	2,858	2,815	26
27	7,677	5,488	4,601	4,106	3,785	3,558	3,388	3,256	3,150	3,064	2,988	2,921	2,873	2,826	2,783	27
28	7,636	5,453	4,568	4,074	3,754	3,528	3,358	3,226	3,120	3,034	2,958	2,891	2,843	2,796	2,753	28
29	7,598	5,420	4,538	4,045	3,725	3,499	3,329	3,198	3,092	3,006	2,930	2,863	2,815	2,768	2,725	29
30	7,562	5,390	4,510	4,018	3,699	3,473	3,304	3,173	3,067	2,981	2,905	2,838	2,790	2,743	2,700	30
31	7,530	5,362	4,484	3,993	3,675	3,449	3,281	3,149	3,043	2,957	2,881	2,814	2,766	2,719	2,676	31
32	7,499	5,336	4,459	3,969	3,652	3,427	3,259	3,127	3,021	2,935	2,859	2,792	2,744	2,697	2,654	32
33	7,471	5,312	4,437	3,948	3,630	3,406	3,238	3,106	3,000	2,914	2,838	2,771	2,723	2,676	2,633	33
34	7,444	5,289	4,416	3,927	3,610	3,386	3,218	3,086	2,980	2,894	2,818	2,751	2,703	2,656	2,613	34
35	7,419	5,268	4,396	3,908	3,592	3,368	3,200	3,068	2,962	2,876	2,800	2,733	2,685	2,638	2,595	35
40	7,314	5,179	4,313	3,828	3,514	3,291	3,124	2,993	2,887	2,801	2,725	2,658	2,610	2,563	2,520	40
60	7,077	4,977	4,126	3,649	3,339	3,119	2,952	2,822	2,716	2,630	2,554	2,487	2,439	2,392	2,350	60
80	6,963	4,881	4,036	3,563	3,255	3,036	2,870	2,740	2,634	2,548	2,472	2,405	2,357	2,310	2,270	80
90	6,925	4,849	4,007	3,535	3,228	3,009	2,844	2,714	2,608	2,522	2,446	2,379	2,331	2,284	2,244	90
100	6,895	4,824	3,984	3,513	3,206	2,987	2,822	2,692	2,586	2,500	2,424	2,357	2,309	2,262	2,222	100
inf.	6,851	4,787	3,949	3,480	3,174	2,955	2,790	2,660	2,554	2,468	2,392	2,325	2,277	2,230	2,190	inf.
inf.	6,635	4,605	3,782	3,319	3,017	2,802	2,639	2,511	2,407	2,321	2,248	2,185	2,130	2,082	2,039	inf.

Fuente: <https://es.scribd.com/document/265696622/Distribucion-F-alfa-0-01>

Con un nivel de significancia de 0.05 y con 9 grados de libertad del numerador y 80 grados de libertad del denominador, según la Imagen 4, el valor crítico para F es:

$$F_{0.05} = 1,999 \quad (25)$$

Con un nivel de significancia de 0.01 y con 9 grados de libertad del numerador y 80 grados de libertad del denominador, según la Imagen 5, el valor crítico para F:

$$F_{0.01} = 2,637 \quad (26)$$

El valor F viene dado por:

$$F = \frac{\frac{SCE}{GLE}}{\frac{SCD}{GLD}} \quad (27)$$

El valor F para los halos de inhibición del limoneno frente a *Escherichia coli* ATCC 8720 es:

$$F = \frac{\frac{43,19676}{9}}{\frac{16,67838}{80}} \quad (28)$$

$$F = 23,022092 \quad (29)$$

El valor F para los halos de inhibición del limoneno frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 es:

$$F = \frac{\frac{269,0568}{9}}{\frac{31,8192}{80}} \quad (30)$$

$$F = 75,162669 \quad (31)$$

## Prueba de hipótesis

Se plantean las siguientes hipótesis para los halos de inhibición del limoneno frente a ambas cepas:

- ☞ Hipótesis nula ( $H_0$ ): La variación de la concentración del limoneno no produce una variación en el diámetro de los halos de inhibición.

$$\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_{10} \quad (32)$$

- ☞ Hipótesis alternativa ( $H_1$ ): La variación de la concentración del limoneno sí produce una variación en el diámetro de los halos de inhibición.

$$\mu_1 \neq \mu_2 \neq \dots \neq \mu_{10} \quad (33)$$

Se emplea la prueba estadística F que dice que, si el valor de F es mayor al valor de  $F_c$  para cierto nivel de significancia, existe la probabilidad a dicho nivel de significancia de que la hipótesis nula sea verdadera. Es decir:

$$F > F_\alpha \text{ (se rechaza la hipótesis nula)} \quad (34)$$

$$F < F_\alpha \text{ (se aprueba la hipótesis nula)} \quad (35)$$

**Prueba de hipótesis de los halos de inhibición del limoneno  
frente a *Escherichia coli* ATCC 8720**

A un nivel de significancia de 0.05, F es mayor a  $F_{0.05}$ :

$$23,022092 > 1,99 \quad (36)$$

A un nivel de significancia de 0.01, F es mayor a  $F_{0.01}$ :

$$23,022092 > 2,637 \quad (37)$$

Por lo tanto, F es mayor para ambos niveles de significancia.

En conclusión, se rechaza la hipótesis nula y se aprueba la hipótesis alternativa:

***“La variación de la concentración del limoneno sí produce una  
variación en el diámetro de los halos de inhibición frente a  
*Escherichia coli* ATCC 8720.”***

**Prueba de hipótesis de los halos de inhibición del limoneno  
frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538**

A un nivel de significancia de 0.05, F es mayor a  $F_{0.05}$ :

$$75,162669 > 1,99 \quad (38)$$

A un nivel de significancia de 0.01, F es mayor a  $F_{0.01}$ :

$$75,162669 > 2,637 \quad (39)$$

Por lo tanto, F es mayor para ambos niveles de significancia.

En conclusión, se rechaza la hipótesis nula y se aprueba la hipótesis alternativa:

***“La variación de la concentración del limoneno sí produce una variación en el diámetro de los halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.”***

## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSIÓN**

El aprovechamiento de los residuos orgánicos puede ser, además de una actividad ecológica, una forma muy barata y rentable de producción, todo dependerá del conocimiento que se tenga y de las herramientas disponibles.

Para llevar a cabo esta tesis, el autor tuvo por bien investigar desde años atrás diferentes tipos de aceites esenciales y realizar sus extracciones. Para ello, el autor iba al Mercado Mayorista Grau a comprar muestras de diferentes plantas que se sepa contengan aceite esencial. En los puestos de venta de plantas medicinales, entre plantas como hierba luisa, menta, eucalipto, canela, clavo de olor, el autor fijó su interés por la composición química de cada aceite esencial. No fue hasta observar en muchas de sus idas al mercado que, en ese y muchos otros, incluso en ferias, centros comerciales, etc., se vende jugo de naranja en cuyo proceso se generan tiras de cáscara de naranja de alta calidad (maduras y frescas), y de averiguar que el aceite esencial de cáscara de naranja posee alrededor de un 90% de limoneno, que el autor se animó por extraer el aceite esencial de esta especie y comprobó, luego de numerosos intentos y de haber probado distintos métodos de extracción, que los residuos de

cáscara de naranja de la venta de jugo poseen un alto rendimiento de aceite esencial por kilo de peso.

Existen muchas especies de naranjas, ya especificadas en el Capítulo II, pero sin duda sólo hay una que se usa para la elaboración de jugo. Esto se comprobó por medio de entrevistas con los vendedores de jugo y los vendedores de naranjas para jugo, quienes además especificaron que existen muchos fundos y, por ende, muchas marcas que producen esta especie de naranja, es por esto que, a pesar de ser de una misma especie, los vendedores llaman a cada una por el nombre del fundo del cual provienen. De todas maneras, los vendedores adquieren la naranja que puedan comprar y no son específicos respecto a la marca. Es por esto que sólo resultó relevante conocer cuál es la especie de la naranja que emplean para la venta de jugo y no de qué marca es.

La especie de naranja fue certificada como *Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia, la misma empleada en los estudios nacionales cotejados (13) (14) (15). Sin embargo, en dichos estudios tomaron muestras de naranjas enteras que compraron en mercados, sin ninguna otra relevancia, para luego pelarlas e inclusive usar partes de la cáscara (como la fibra blanca llamada albedo) que no tienen utilidad. Este punto es el que diferencia esta tesis de las otras: que se aprovecha un residuo orgánico de alta calidad y se obtiene de éste un compuesto puro con

muchas utilidades y mucho potencial económico debido a su bajo coste de materia prima y al alto rendimiento.

El rendimiento promedio de la extracción del aceite esencial de la cáscara de naranja *Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia por arrastre de vapor de agua fue de 2,7%. Dicho rendimiento es mucho mayor que los obtenidos en otros estudios cotejados: 1,26% de Ramírez Paz y colegas por hidrodestilación (9), 1,14% de Luque Lipa y colegas por arrastre de vapor de agua (13), 0,58% de Guerra y colegas por hidrodestilación (12), 0,4% de Juárez y colegas por hidrodestilación (15) y 0,2% de Yáñez Rueda y colegas (3). Se puede inferir entonces una mayor eficiencia de la extracción debido al método diseñado por el autor de esta tesis, o una mayor concentración de aceite esencial de las muestras recolectadas, sea porque el proceso de pelado disminuya las pérdidas de aceite o porque la especie de naranja empleada posea en su cáscara una mayor concentración de aceite esencial que las otras de los diferentes estudios.

En el proceso de destilación fraccionada se tuvo que emplear un multímetro digital con termocupla debido a su mayor rango de temperatura y mejor visualización de la misma en la pantalla LCD.

La primera destilación fraccionada fue llevada a cabo con una cocina eléctrica en donde se hizo calentar el balón con la muestra sumergido hasta la mitad de aceite de girasol, es decir, a baño María. Esto fue ineficaz, ya

que el sistema no alcanzaba los grados necesarios para destilar el limoneno. Así fue que se optó por usar el mechero de Bunsen y calentar a fuego directo, controlando de a pocos la salida de gas y la ventanilla de oxigenación para mantener una temperatura constante.

El limoneno es el terpeno mayoritario del aceite esencial de naranja, incluso más que del limón (del cual proviene su nombre). En pruebas extras hechas por el autor, se pudo comprobar que este compuesto actúa como solvente apolar, pudiendo disolver materiales acrílicos, esmaltes, algunos polímeros, tintas, etc. Posee un aroma muy agradable, pudiendo ser usado como aromatizante en humidificadores, productos de limpieza, perfumes, aromaterapia, como excipiente de formulaciones farmacéuticas, etc. Este enfoque es el que se espera darle al limoneno: producto base con mucha demanda que pueda ser producido industrialmente por medio de empresas que se atrevan a hacerlo o, mejor dicho, a innovar.

En el ensayo *in vitro* se trabajó con el dimetilsulfóxido al 10% (DMSO) como diluyente del limoneno debido a su alta viscosidad, lo cual reduce la capacidad de la dilución y permite una distribución pareja del limoneno a través del medio. Este disolvente aprótico de baja toxicidad es recomendado por el CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) por no presentar ninguna actividad antibacteriana y, por ende, no interferir en los resultados.

Usualmente, en muchos trabajos de tesis se trabaja con aceites esenciales como antimicrobiano o antimicótico, pero pocos lo hacen con compuestos puros extraídos de estos aceites. Por ejemplo, se podría purificar el cinamaldehído del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) al cual compone en un 72% (33); el eugenol del aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) al cual compone en un 80% (34); y estudiar la actividad antimicrobiana de estos compuestos puros, aunque para fines prácticos no sea de mucha utilidad económica, debido al alto costo (aunque alto rendimiento) de estas especies.

Estudios sobre la actividad antimicrobiana *in vitro* del limoneno son muy escasos en nuestro idioma. Lo más aproximado que se pudo encontrar respecto a las fuentes bibliográficas es sobre la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de cáscara de naranja, del cual deriva.

En el estudio **“Development of an antibacterial impregnated support using *Citrus sinensis* essential oil as active ingredient”** llevado a cabo en Cartagena por León y colaboradores (2023), desarrollaron un soporte antibacteriano impregnado con aceite esencial de naranja como principio activo y observaron que la formulación idónea a concentración de 2% de aceite esencial de naranja presenta actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (6). Por otro lado, en el estudio **“Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: a comparative**

**study**” llevado a cabo en Rumania por Man y colaboradores (2019), compararon diferentes aceites esenciales y su actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas y observaron que el monoterpeno D-limoneno sintético y el obtenido de especies del género *Citrus* posee un alto índice bactericida frente a, entre otras, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (8). Ambos estudios indican que, en efecto, el aceite esencial de naranja y el limoneno derivado de estos poseen actividad antibacteriana, contrariando los resultados de esta tesis.

En el estudio “**Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against *Listeria monocytogenes***” llevado a cabo en China por Yingjie Han y colaboradores (2019), por medio de la microscopía electrónica de barrido (SEM), observaron que el limoneno causó la destrucción de la integridad celular y la estructura de la pared de *L. monocytogenes*. El aumento de la conductividad y la fuga de ácidos nucleicos y proteínas concluyeron que el limoneno tiene un efecto notable en la permeabilidad de la membrana celular. Además, la disminución del ATP, la actividad de la ATPasa y la actividad del complejo de la cadena respiratoria indicaron que el limoneno podría obstaculizar la síntesis de ATP (35). Esto puede elucidar un poco más el mecanismo de acción del limoneno frente a ciertas bacterias grampositivas como *L. monocytogenes*, pudiendo ser también el caso frente a *Staphylococcus aureus*.

En el estudio “**Mechanism of bacterial inactivation by (+)-limonene and its potential use in food preservation combined processes**” llevado a cabo por Laura Espina y colaboradores (2013), estudiaron el mecanismo de acción del limoneno frente a *E. coli* BJ4 en diferentes parámetros. Respecto al pH, observaron que el limoneno es más bactericida a pH=4 que a pH=7; respecto a la temperatura, la exposición a un calor subletal no disminuyó su resistencia frente al limoneno, sin embargo, la exposición a un shock de frío subletal sí la disminuyó. Por medio de la microespectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada (ATR-IRMS) pudieron constatar que a pH=4 y con un shock de frío subletal se produjo una alteración de las proteínas y un aumento de la permeabilidad de la membrana externa. El estudio del mecanismo de inactivación por el limoneno condujo al diseño de un proceso combinado sinérgico con calor para la inactivación del patógeno *E. coli* O157:H7 en jugos de frutas. El estudio, además, finaliza resaltando el potencial uso del limoneno en la preservación de alimentos, ya sea actuando solo o en combinación con tratamientos térmicos letales (36).

Para finalizar, la poca actividad antimicrobiana del limoneno puede deberse a diversos factores, entre ellos se puede descartar el factor del procedimiento realizado en el ensayo *in vitro* ya que los controles resultaron en cada caso como se esperaba. Además, se debe reconocer el hecho de que en una planta existen diferentes principios activos, y que muchos de

estos se sinergizan, es decir, que su actividad terapéutica no depende de solamente un principio activo, sino de la conjunción de todos, y el limoneno puede que no esté exento de esto. De todas formas, los resultados de esta tesis sirven para descartar al limoneno como un agente antibacteriano, pero deja la puerta abierta para el estudio e investigación de sus muchas otras propiedades.

## CONCLUSIONES

- Primera:** Se determinaron los halos de inhibición de diferentes concentraciones del limoneno obtenido de residuos de cáscara de *Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia, resultando el mayor halo de inhibición de 7,73 mm con limoneno al 30% frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.
- Segunda:** Se determinaron los halos de inhibición de diferentes concentraciones del limoneno obtenido de residuos de cáscara de *Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia, resultando el mayor halo de inhibición de 10,26 mm con limoneno al 100% frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
- Tercera:** Se determinó que el limoneno obtenido de residuos de cáscara de *Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia no posee una concentración mínima inhibitoria frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.
- Cuarta:** Se determinó que el limoneno obtenido de residuos de cáscara de *Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia no posee una concentración mínima inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

**Quinta:** Se determinó que el limoneno obtenido de residuos de cáscara de *Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia no posee una concentración mínima bactericida frente a *Escherichia coli* ATCC 8720.

**Sexta:** Se determinó que el limoneno obtenido de residuos de cáscara de *Citrus sinensis* [L.] Osbeck variedad Valencia no posee una concentración mínima bactericida frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

## RECOMENDACIONES

1. Implementar con materiales, equipos y reactivos nuevos los Laboratorios de la Escuela de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna.
2. Valorar el alto rendimiento (2,7%) obtenido del proceso de extracción del aceite esencial a partir de residuos de cáscara de naranja, así como del proceso de destilación fraccionada que permitió obtener limoneno con 100% de pureza según el análisis cromatográfico llevado a cabo.
3. Realizar ensayos *in vitro* del limoneno en otras especies de bacterias y hongos que permitan ampliar el conocimiento respecto a su actividad antimicrobiana.
4. Realizar ensayos *in vivo* en ratas del limoneno debido a su potencial antitumoral descubierto en los últimos años, para evaluar su efectividad y toxicidad, así como sus dosis terapéuticas.
5. Estudiar el mecanismo de acción del limoneno frente a microorganismos susceptibles.
6. Evaluar modificar la estructura química del limoneno para desarrollar compuestos semisintéticos con mejor efectividad o con distintas propiedades.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gomes H., Dos Santos J., Carvalho M., Picot L., Fruitier-Arnaudin I. y Groult H. Anticancer activity of limonene: A systematic review of target signaling pathways. *Phytotherapy Research*, Volumen 35, Número 9, Páginas 4957 - 4970 [Online].; Setiembre 2021. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.7125>
2. Ortiz-Andrade R., Araujo-León J., Centeno-Hoil G. y Sansores-Chuc M. Las cáscaras de naranja: ¿Desechos de la agricultura o riqueza farmacéutica?. *Herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.* [Online].; Agosto 2023. Disponible en: [https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde\\_Herbario/2023/2023-08-17-ROrtiz-Las-cascaras-de-naranja.pdf](https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2023/2023-08-17-ROrtiz-Las-cascaras-de-naranja.pdf)
3. Yáñez X., Lugo L. y 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*, Volumen 5, Número 1, Páginas 3 - 8 [Online].; Agosto 2006. Disponible en: [https://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portallG/home\\_10/recursos/general/pag\\_contenido/publicaciones/bistua\\_revista\\_ciencias\\_basica/2007/12082010/rev\\_bistua\\_vol5\\_num1\\_art1.pdf](https://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portallG/home_10/recursos/general/pag_contenido/publicaciones/bistua_revista_ciencias_basica/2007/12082010/rev_bistua_vol5_num1_art1.pdf)

4. Sessini V., Palenzuela M., Damián J., Sanchez D. y Mosquera M. El limoneno: uno de los terpenos más usados y su papel en la industria de los bioplásticos. *Revista de plásticos modernos: ciencia y tecnología de polímeros*, 119 (757) [Online].; 2020. Disponible en: [https://ebuah.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/44505/Sessini\\_Limonero\\_RevPlastMod\\_2020.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://ebuah.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/44505/Sessini_Limonero_RevPlastMod_2020.pdf?sequence=3&isAllowed=y)
5. Moncayo M., Reyes A. y Carrillo M. Aprovechamiento de subproductos agronómicos. *Revista Académica de Investigación Tlatemoani*, Número 29 [Online].; Julio 2018. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7337182.pdf>
6. León D., De la Espriella S., Granados C., León G. y Gonzáles M. Development of an antibacterial impregnated support using *Citrus sinensis* essential oil as active ingredient. *Revista Cubana de Farmacia*. 2024;57:e989 [Online].; 2024. Disponible en: <https://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/download/989/559>
7. Oliveira J., Aguiar G., Batista L., Alves E., Silva A. y Magalhaes R. Mechanism of action of various terpenes and phenylpropanoids against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. [Online].; Mayo 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab052>
8. Man A., Santacroce L., Jacob R., Mare A. y Man L. Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: a comparative

- study. *Pathogens* 2019, 8, 15 [Online].; Enero 2019. Disponible en: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.3390/pathogens8010015>
9. Ramírez G., Rosales V., Escalante A., Espíritu G., Martínez M. y Molina M. Efecto inhibitorio de los aceites esenciales de *Citrus sinensis* sobre *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus epidermidis*. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, Año 5, Número 5 [Online].; Julio 2019. Disponible en: [https://zaloamati.azc.uam.mx/bitstream/handle/11191/7892/Efecto\\_inhibitorio\\_de\\_los\\_aceites\\_esenciales\\_de\\_Citrus\\_sinensis\\_2019.pdf?sequence=1](https://zaloamati.azc.uam.mx/bitstream/handle/11191/7892/Efecto_inhibitorio_de_los_aceites_esenciales_de_Citrus_sinensis_2019.pdf?sequence=1)
  10. Torrenegra M., Pájaro N. y León G. Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*. *Revista Colombiana de Ciencia Química Farmacéutica*, Volumen 46(2), 160 - 175 [Online].; Febrero 2017. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v46n2.67934>
  11. Sagaste C., Montero G., Gochev V., J. A., León J. y García C. Evaluación de la actividad inhibitoria del aceite esencial de naranja contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Discurso de conferencia de Memorias del XXXVI Encuentro Nacional de la AMIDIQ del 5 al 8 de mayo de 2015, Cancún, Quintana Roo, México [Online].; Mayo 2015. Disponible en: <https://www.researchgate.net/profile/Gisela->

Montero/publication/282329372\_EVALUACION\_DE\_LA\_ACTIVIDAD\_INHIBITORIA\_DEL\_ACEITE\_ESENCIAL\_DE\_NARANJA\_CONTRA\_Escherichia\_coli\_Staphylococcus\_aureus\_y\_Candida\_albicans/links/560c3f6308aea68653d35f0d/EVALUACION-DE-L

12. Guerra L., Soto L., Medina Z., Ojeda G. y Peña J. Actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus sinensis*) variedad Valencia frente a microorganismos grampositivos y gramnegativos. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia, Número 31, Páginas 215 - 232 [Online].; Febrero 2014. Disponible en:  
<https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/download/27157/27779/>
13. Luque M. y Márquez R. Actividad antioxidante y efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscara de *Citrus sinensis* variedad Valencia Late. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico en la Universidad Norbert Wiener de Lima, Perú [Online].; 2019. Disponible en:  
[https://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13053/5092/T061\\_15842224\\_25758592\\_T.pdf;jsessionid=370E9FA5BAF529FF2B30DE460501CB53?sequence=3](https://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13053/5092/T061_15842224_25758592_T.pdf;jsessionid=370E9FA5BAF529FF2B30DE460501CB53?sequence=3)
14. Condori D. y Vilcazan A. Determinación de capacidad inhibitoria microbiana con aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) y romero

- (*Rosmarinus officinalis*) en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por el método antibiograma. Tesis para optar el grado de Bachiller en Ingeniería de Industrias Alimentarias en la Universidad Peruana Unión de Juliaca, Perú [Online].; Diciembre 2019. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/478791095.pdf>
15. Juárez J., Castro A., Jáuregui J., Lizano J., Carhuapoma M. y Choquesillo F. Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. Ciencia e Investigación, Volumen 13, Páginas 9 - 13 [Online].; Abril 2010. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/download/3157/2643/11104>
16. Padrón J. y Rocha M. Variedades comerciales de cítricos para Nuevo León y Tamaulipas. Centro de Investigación Regional del Noreste Campo Experimental General Terán, Folleto Técnico Número 8 [Online].; Diciembre 2007. Disponible en: <https://www.compucampo.com/tecnicos/variedadescomerciales-citricos-nl-tams.pdf>
17. Sierra A. La naranja: la reina del invierno. Hemeroteca del Colegio de Farmacéuticos de Córdoba [Online]. Disponible en: <https://hemeroteca.cofco.org/ficheros/Naranja2.pdf>

18. Ancillo G. y Medina A. Monografías botánicas: los cítricos. Jardín Botánico de la Universidad de Valencia, Volumen 2 [Online].; 2014. Disponible en: [https://issuu.com/jardibotanicdelauniversitatdevalenc/docs/001-152\\_los\\_citricos\\_b](https://issuu.com/jardibotanicdelauniversitatdevalenc/docs/001-152_los_citricos_b)
19. Ramos E. Perú produjo 553 mil toneladas de naranja Valencia en 2020. Reporte de la Dirección General de Desarrollo Agrícola y Agroecología del Midagri [Online].; 7 de setiembre de 2021. Disponible en: <https://agraria.pe/index.php/noticias/peru-produjo-553-mil-toneladas-de-naranja-valencia-en-2020-25362#:~:text=Con%20una%20productividad%20promedio%20de,pa ndemia%20por%20sus%20propiedades%20vitam%C3%ADnicas>
20. Agraria.pe. La naranja es el cultivo sensación en Tacna. Reporte de la Dirección General de Desarrollo Agrícola y Agroecología del Midagri [Online].; 19 de junio de 2023. Disponible en: <https://www.agraria.pe/index.php/noticias/la-naranja-es-el-cultivo-sensacion-en-tacna-32207>
21. Díaz J. y Martínez J. Cantidad y calidad de aceites esenciales en hojas de cuatro especies del género *Eucalyptus* - El Mantaro. Tesis para optar el título profesiona de Ingeniero Forestal y Ambiental en la Universidad Nacional del Centro del Perú en Huancayo, Perú [Online].; 2013. Disponible en:

<https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/3397/Diaz%20Arcos%20-%20Martinez%20Chuquillanqui.pdf?sequence=1>

22. Patiño L., Saavedra A. y Martínez J. Extracción por arrastre de vapor de aceite esencial de romero. Ciencias Tecnológicas y Agrarias, Handbook USFX Sucre, Bolivia [Online].; 2014. Disponible en: <https://www.studocu.com/ec/document/universidad-central-del-ecuador/ingenieria-quimica/art15-metodos-de-extraccion/95581605>
23. López M., Triana J., Pérez F. y Torres M. Métodos físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas. Departamento de Química de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria [Online].; Febrero 2005. Disponible en: <https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/436/1/494.pdf>
24. Pérez É. y Rivas A. Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por métodos fenotípicos. Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia [Online].; 2021. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/167611/P%C3%A9rez?sequence=1>
25. Horna G., Silva M., Vicente W. y Tamariz J. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de

- Enfermedades Neoplásicas. Revista Médica de la Universidad Cayetano Heredia de Lima, Perú, Número 16 (1) [Online].; 2005. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2005000100007](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2005000100007)
26. Universidad Pontificia de Salamanca - Madrid. Capítulo 10: Análisis de varianza. [Online].; 2022. Disponible en: [https://iviva.gva.es/documents/161862582/162430134/capitulo\\_10\\_MEI.pdf/058d15ec-9efb-4ce7-91ac-c7a2e4ccced2](https://iviva.gva.es/documents/161862582/162430134/capitulo_10_MEI.pdf/058d15ec-9efb-4ce7-91ac-c7a2e4ccced2)
27. Real Academia Española de la Lengua. Comercio ambulante. Vigésima tercera edición.; 2014.
28. Real Academia Española de la Lengua. Hesperidio. Vigésima tercera edición.; 2014.
29. Antezana B. Obtención de aceite esencial e hidrolato de hierbabuena (*Mentha spicata*) mediante el proceso de de destilación por arrastre de vapor. Tesis para obtener el título académica de Licenciatura en Química Industrial en la Universidad Mayor de San Andrés de La Paz, Bolivia [Online].; 2017. Disponible en: <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/13582/EG-1911-Antezana%20Ruiz%2C%20Bryant%20Fabian.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

30. Instituto Nacional del Cáncer. Cepa. [Online].; 2024. Disponible en:  
<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/cepa-de-organismos>
31. Ochoa K., Paredes L., Bejarano D. y Silva R. Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). Scientia Agropecuaria Número 3, Páginas 291 - 302 [Online].; Diciembre 2012. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4104068.pdf>
32. García J., Cantón R., García E., Gomes L., Martínez L. y Rodríguez C. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimiento en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Online].; 2000. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
33. Sánchez L. Determinación de compuestos funcionales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*). Tesis para obtener el título de Ingeniero Bioquímico en el Instituto Politécnico Nacional de la ciudad de México D.F. [Online].; Noviembre 2013. Disponible en: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/25267/S%C3%81NCHEZ%20MIRANDA%20LUISA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

34. González D. y Rojas K. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de la especie clavo de olor. Tesis para obtener el título de bacterióloga en la Universidad Católica de Manizales [Online].; 2018. Disponible en: <https://repositorio.ucm.edu.co/bitstream/10839/2177/1/Daniela%20Gonzalez%20Castro.pdf>
35. Han Y., Sun Z. y Chen W. Antimicrobial Susceptibility and Antibacterial Mechanism of Limonene against *Listeria monocytogenes*. Artículo publicado en PubMed Central (PMC6982812) [Online].; Diciembre 2019. Disponible en: <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules25010033>
36. Espina L., Gelaw T., Lamo S., Pagán R. y García-Gonzalo D. Mechanism of Bacterial Inactivation by (+)-Limonene and Its Potential Use in Food Preservation Combined Processes. Artículo publicado en PLOS ONE [Online].; Febrero 2013. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056769>

# **ANEXOS**

**Anexo 1.** Carro ambulante de venta de jugo de naranja en el Mercado Mayorista Grau.



**Anexo 2.** Jaba de madera con naranjas que se expenden en los puestos de frutas ubicados en el exterior del Mercado Mayorista Grau.



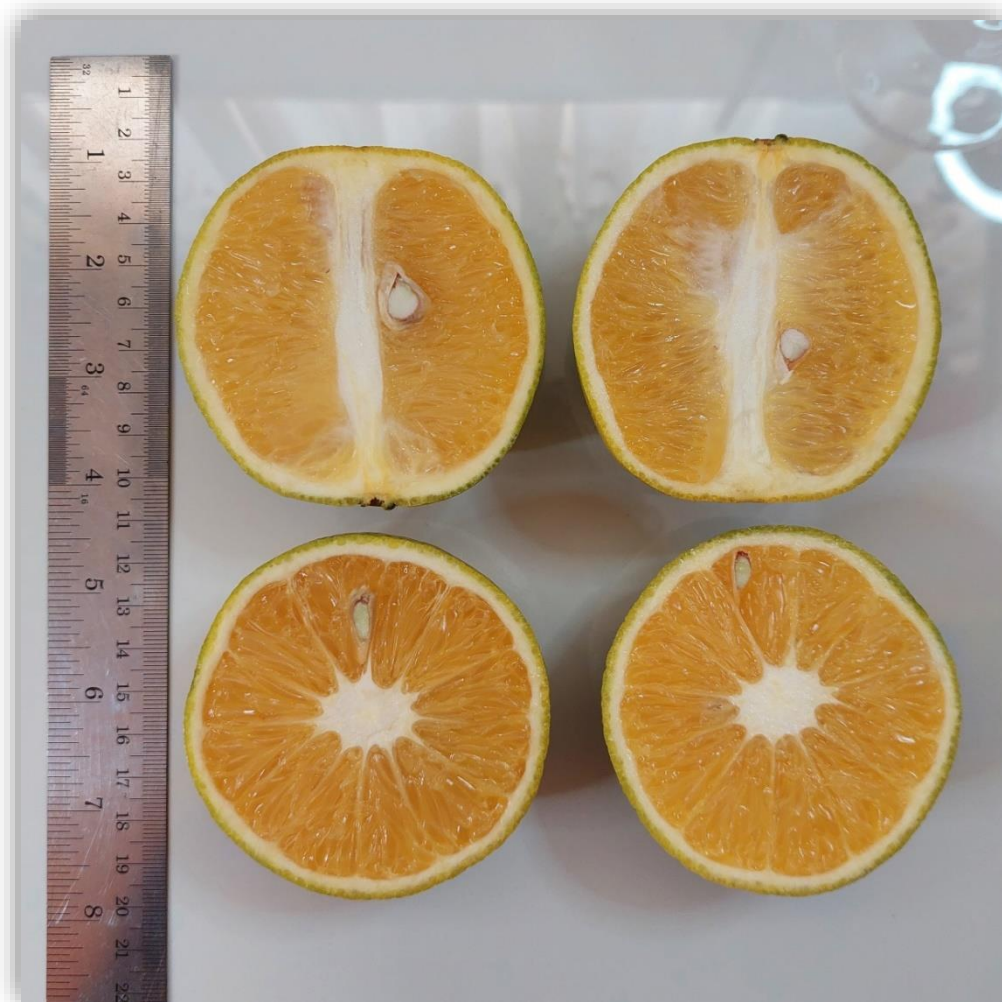
**Anexo 3. Naranja dulce.**



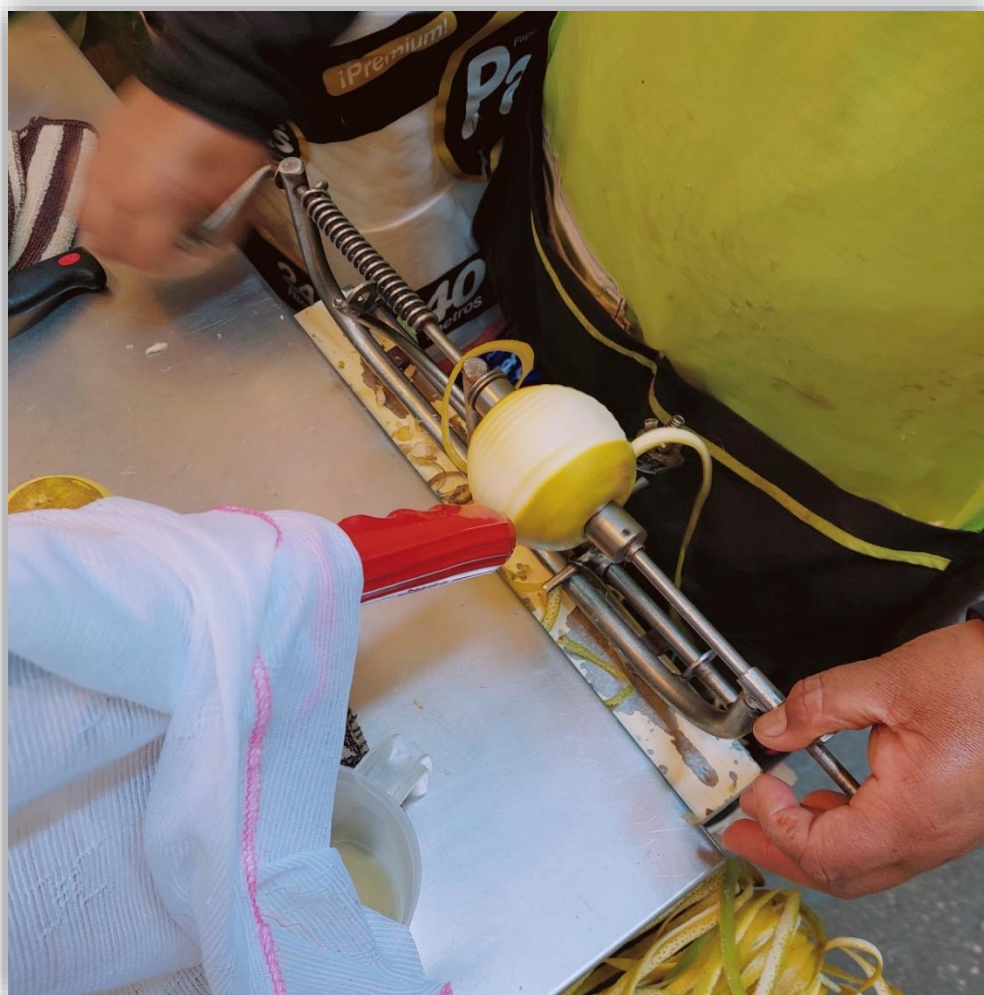
**Anexo 4.** Diámetro y aspecto de la naranja dulce.



**Anexo 5.** Corte transversal y longitudinal de la naranja dulce.



**Anexo 6.** Proceso de pelado de una naranja en un puesto ambulante.



**Anexo 7.** Ancho de una tira de cáscara de naranja.



**Anexo 8.** Tiras de cáscara de naranja.



**Anexo 9.** Adquisición de la muestra en un puesto ambulante de venta de jugo de naranja dentro del Mercado Mayorista Grau.



**Anexo 10.** Adquisición de la muestra en un puesto ambulante de venta de jugo de naranja dentro del Mercado Mayorista Grau.



**Anexo 11.** Adquisición de la muestra en un puesto ambulante de venta de jugo de naranja dentro del Mercado Mayorista Grau.



**Anexo 12.** Extendido de las tiras de cáscara de naranja.



**Anexo 13.** Corte y disposición de la muestra dentro de las bandejas de deshidratación.



**Anexo 14.** Deshidratación de las muestras de cáscara de naranja.



**Anexo 15.** Tira de cáscara de naranja deshidratada.



**Anexo 16.** Muestra de cáscara de naranja deshidratada.



**Anexo 17.** Constancia de identificación taxonómica de la especie de naranja.

**CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA**

Yo, Dr. Pablo Juan Franco León, Docente de la Facultad de Ciencias, de la Cátedra de Botánica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, dejo constancia que:

La muestra alcanzada al laboratorio de Botánica por Bach. **Enzo Javier Montoya Carita**, identificado con DNI N° 73880926; de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, cuya determinación taxonómica servirá para la realización de su Tesis: "Actividad antibacteriana *in vitro* del limoneno obtenido de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck variedad Valencia) frente a *Escherichia coli* ATCC 8720 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538", ha sido estudiada y clasificada como *Citrus sinensis* y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISIÓN MAGNOLIOPHYTA

CLASE MAGNOLIOPSIDA

ORDEN SAPINDALES

FAMILIA RUTACEAE


GÉNERO *Citrus*

ESPECIE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck variedad Valencia

Nombre vulgar: Naranja dulce

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Tacna, 13 de agosto del 2024.

  
Dr. Pablo Juan Franco León  
C.B.P. 2097

**Anexo 18.** Equipo de extracción de aceite esencial por arrastre de vapor de agua.



**Anexo 19. Pesaje de muestra.**



**Anexo 20.** Muestra dentro de la olla luego de haberle extraído el aceite esencial.



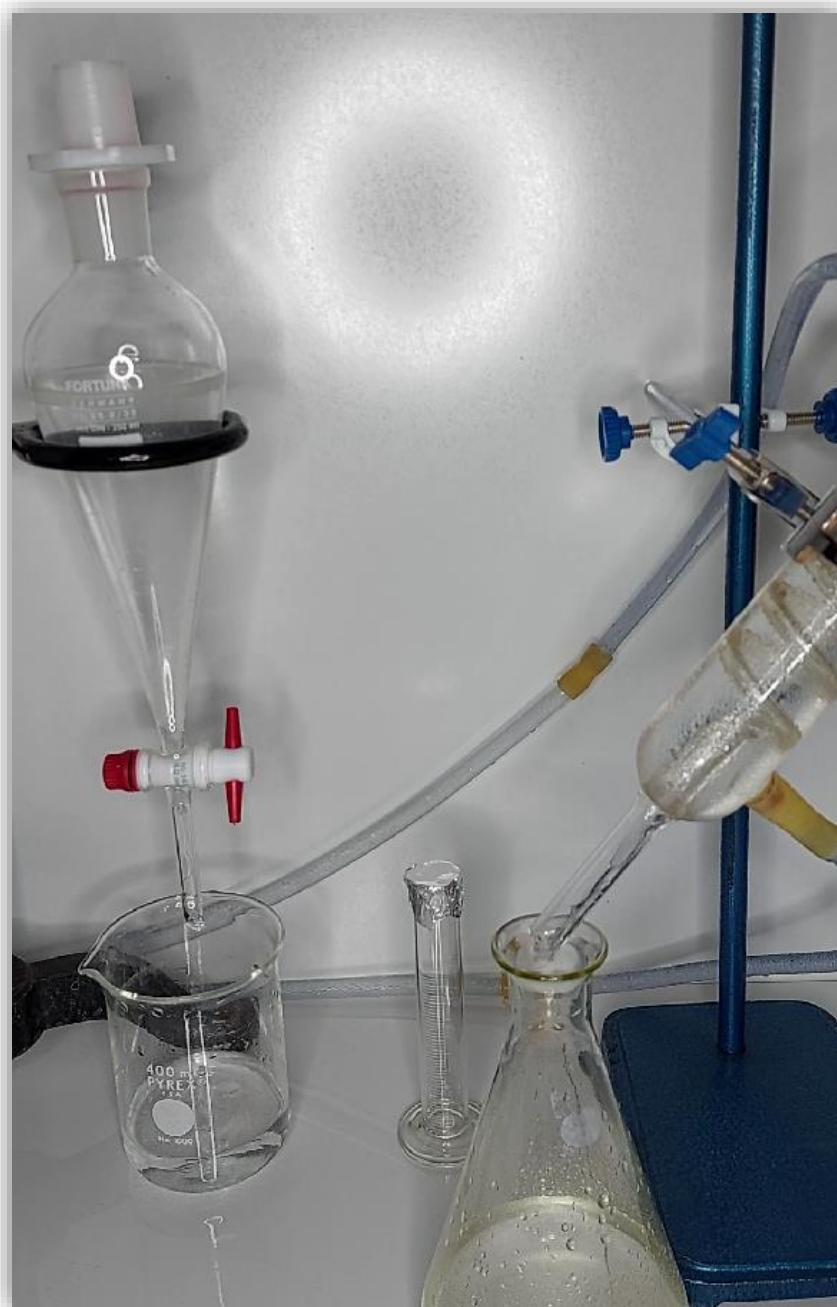
**Anexo 21.** Bomba de agua del sistema de refrigeración.



**Anexo 22.** Cubeta con hielo, detrás el balde del sistema de refrigeración.



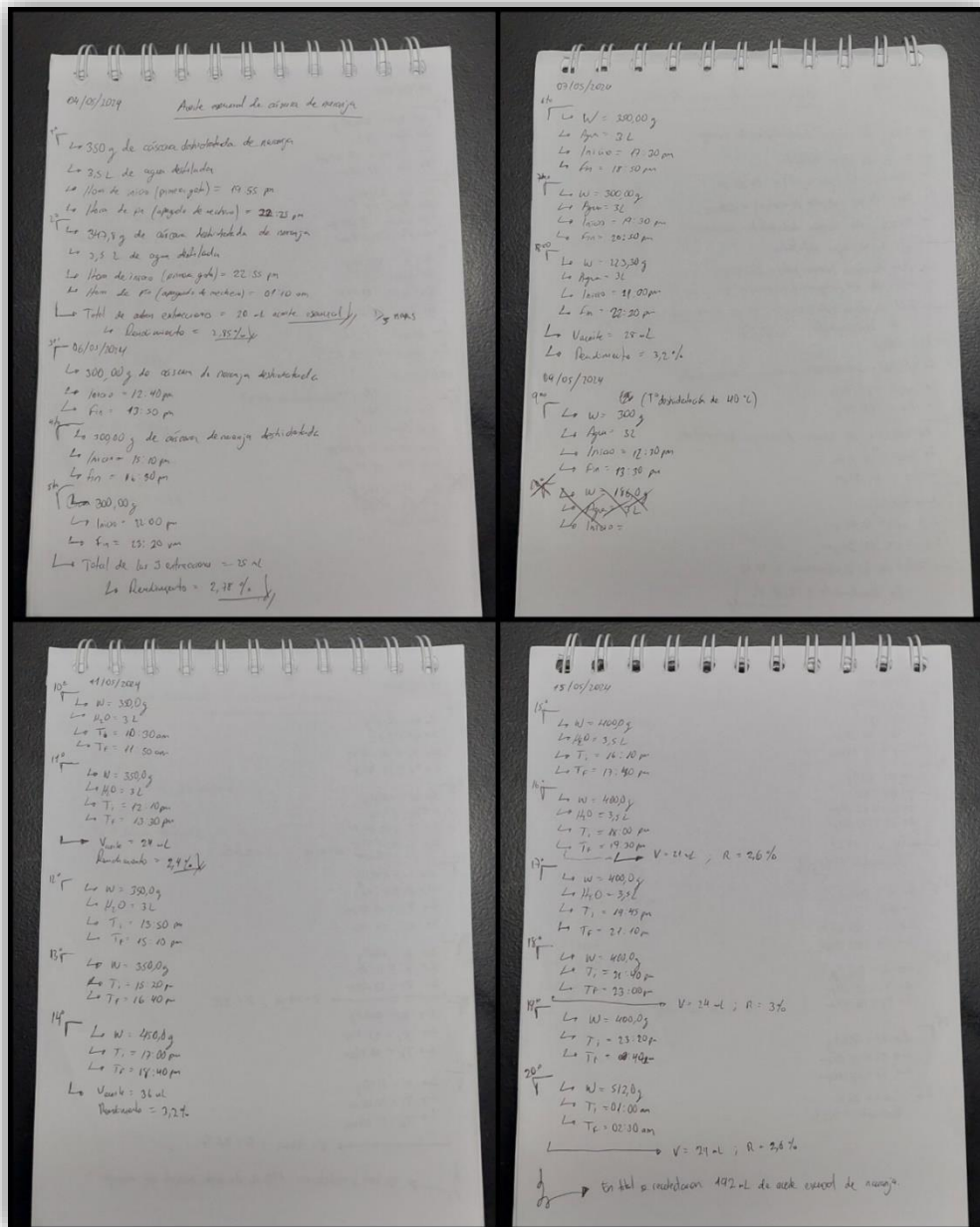
**Anexo 23.** Destilado y separación de fases siendo realizadas al mismo tiempo.



**Anexo 24.** Muestra de aceite esencial extraído en un día.



**Anexo 25.** Páginas de la bitácora con el registro de las extracciones de aceite esencial.



**Anexo 26.** Total de aceite esencial obtenido luego de 20 extracciones.



**Anexo 27.** Equipo de destilación fraccionada Glassco de 250 mL.



**Anexo 28.** Primera destilación fraccionada del limoneno en pleno proceso.



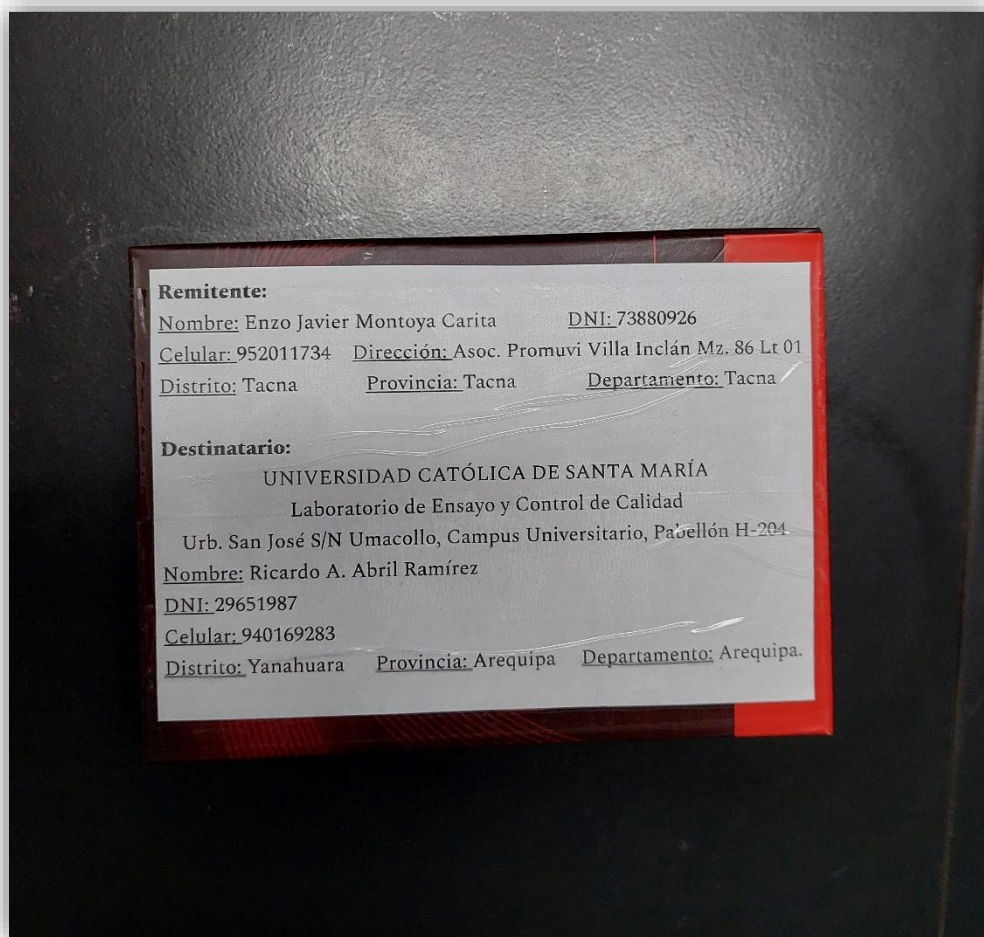
**Anexo 29. Toma de muestra de las fracciones.**



**Anexo 30.** Segunda destilación fraccionada llevada a cabo a 175 °C.



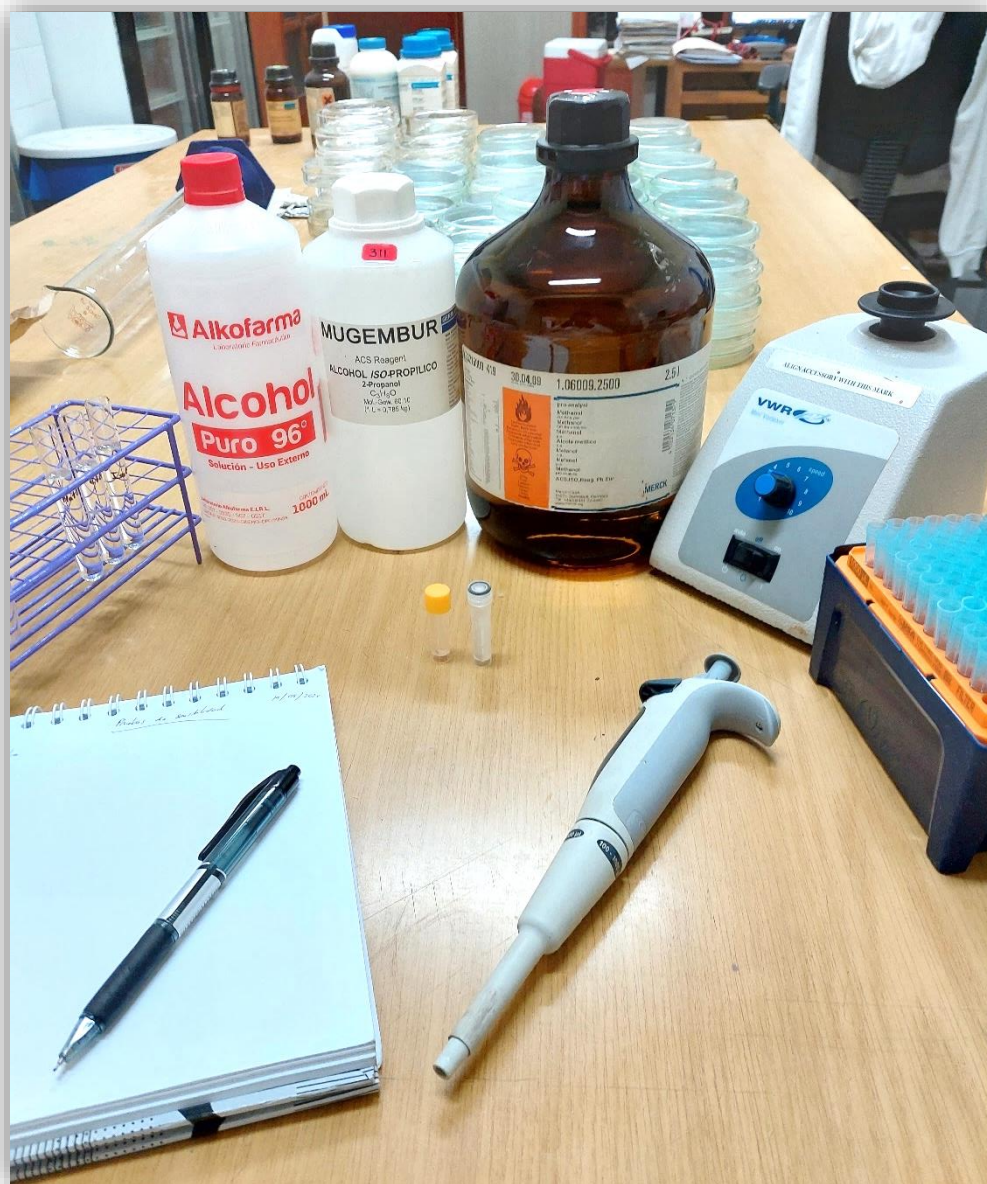
**Anexo 31.** Paquete de envío con la muestra de la fracción destilada a 175 °C.



**Anexo 32.** Cálculo de la densidad del limoneno.



**Anexo 33.** Ensayo de solubilidad del limoneno en diferentes alcoholes.



**Anexo 34.** Agitación de la mezcla para la determinación de la solubilidad del limoneno en diferentes alcoholes.



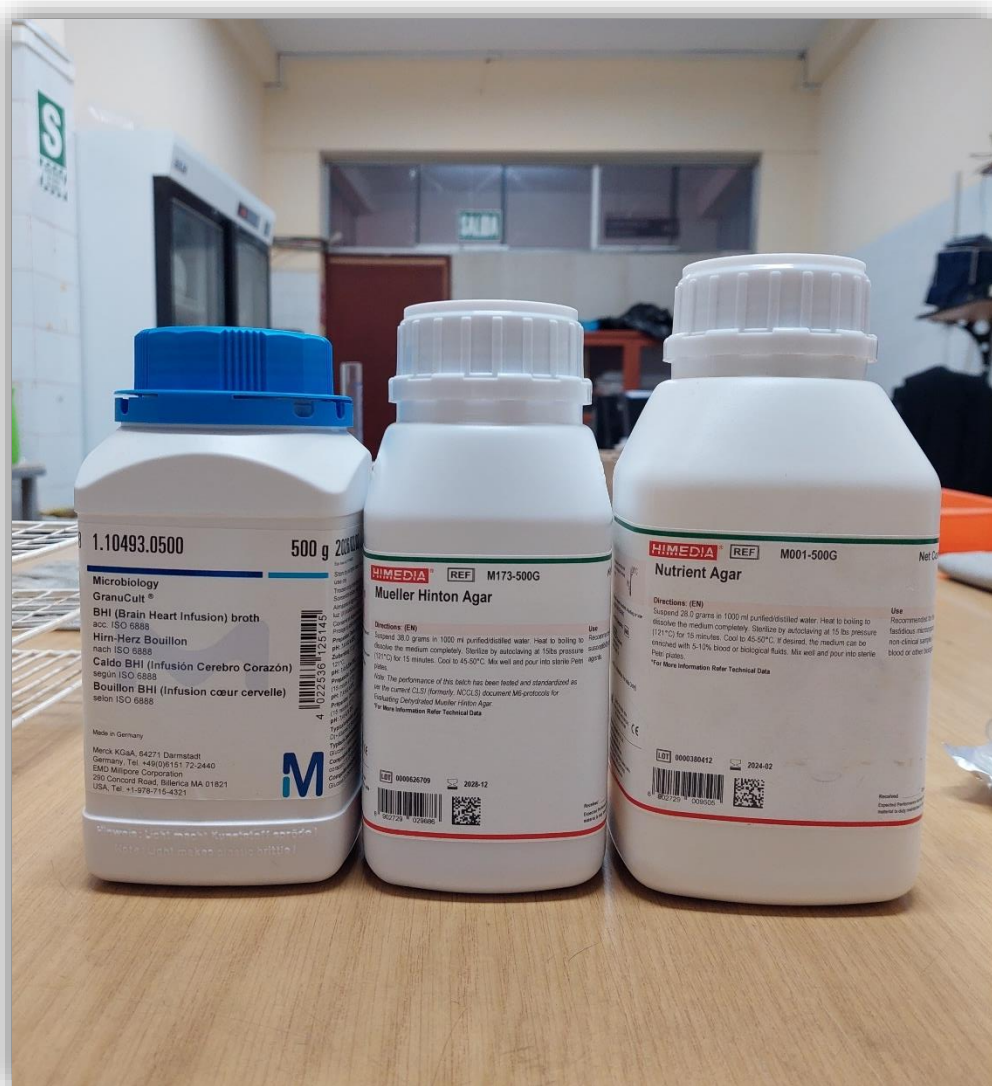
**Anexo 35.** Tubos de ensayo con la mezcla en emulsión (etanol) al lado de otros tubos de ensayo con mezclas completamente solubilizadas.



**Anexo 36.** Vestimenta del autor en el desarrollo de los trabajos dentro del laboratorio de Microbiología.



**Anexo 37.** Medios de cultivo empleados en el ensayo: caldo Infusión Cerebro Corazón (izquierda), agar Müller Hinton (centro) y agar Nutritivo (derecha).



**Anexo 38.** Tubos de ensayo con caldo BHI.



**Anexo 39.** Preparación del agar Müller Hinton.



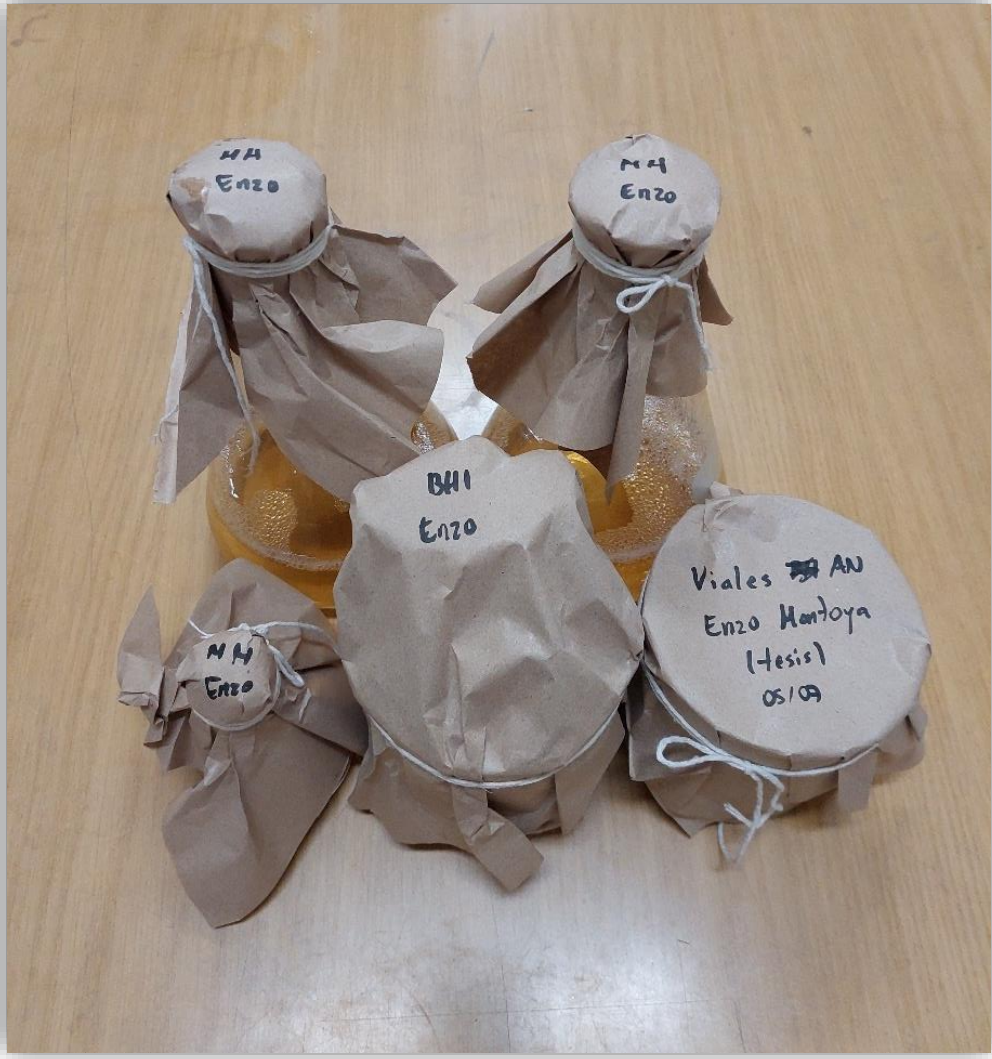
**Anexo 40.** Preparación de las placas con agar Müller Hinton.



**Anexo 41.** Preparación de agar Nutritivo en viales con un ángulo de inclinación de 45°.



**Anexo 42.** Preparaciones de los medios de cultivo forradas y rotuladas.



**Anexo 43.** Proceso de esterilización en autoclave.



**Anexo 44.** Viales con *Escherichia coli* (izquierda) y *Staphylococcus aureus* (derecha).



**Anexo 45.** Primer paso: preparación de la suspensión del agente bacteriano.



**Anexo 46.** Proceso de incubación.



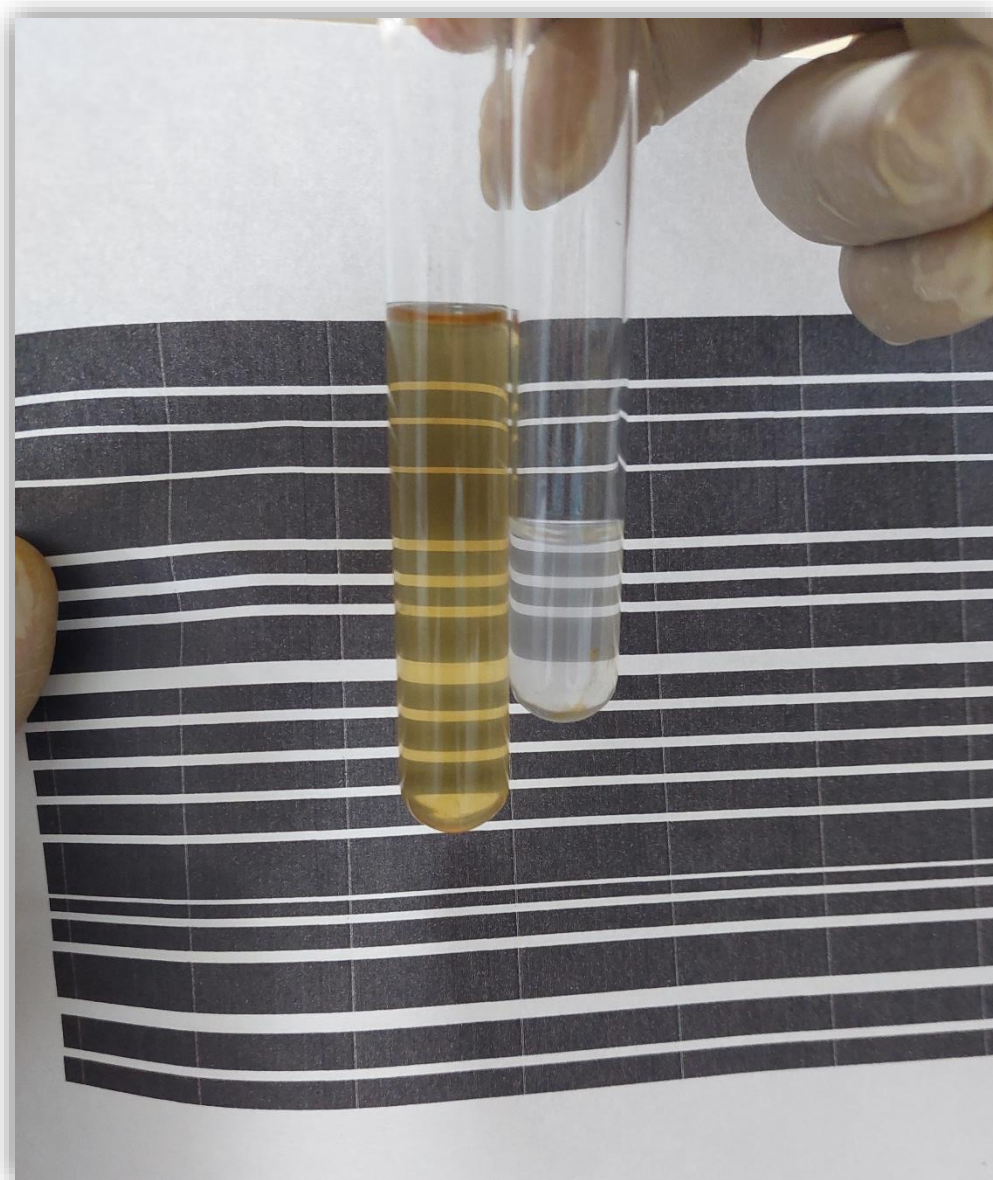
**Anexo 47.** Segundo paso: preparación de cultivo en vial con la suspensión del agente bacteriano por siembra en estría y agotamiento.



**Anexo 48.** Tercer paso: preparación de la suspensión final del agente bacteriano.



**Anexo 49.** Nefelometría de McFarland.



**Anexo 50. Discos de sensibilidad inactivados.**



**Anexo 51.** Preparación de los discos de sensibilidad con las diluciones de limoneno.



**Anexo 52. Inoculación de la suspensión bacteriana.**



**Anexo 53.** Siembra por diseminación en superficie.



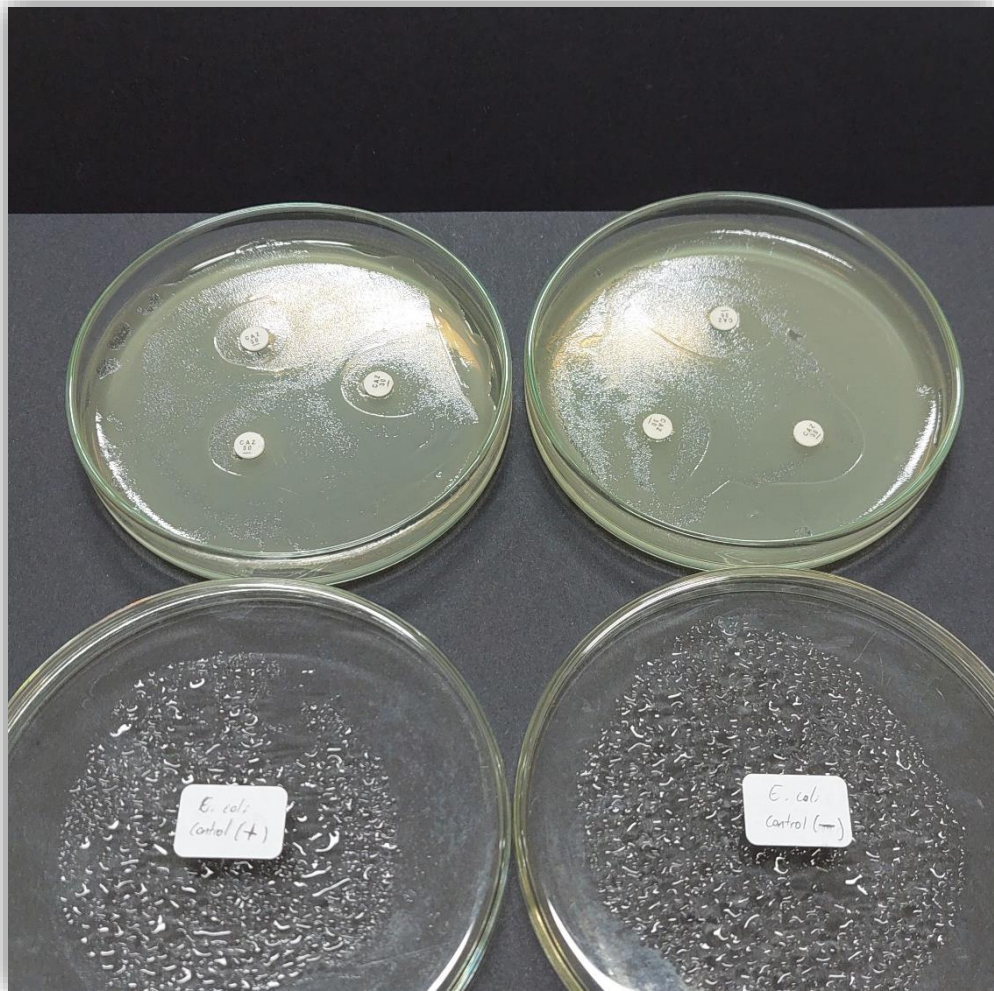
**Anexo 54.** Colocación de los discos de sensibilidad en las placas.



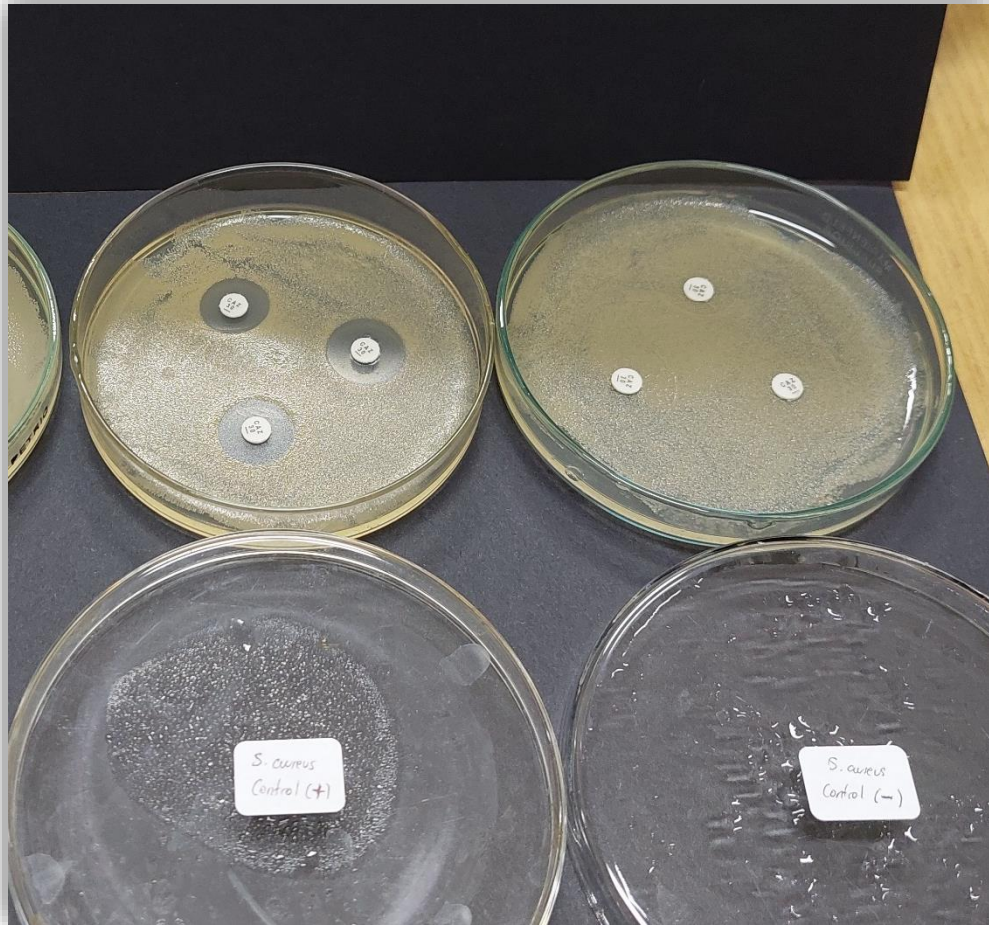
**Anexo 55.** Medición de los halos de inhibición (en la imagen, control positivo para *S. aureus*).



**Anexo 56.** Placas de control positivo y negativo para *E. coli*.



**Anexo 57.** Placas de control positivo y negativo para *S. aureus*.



**Anexo 58.** Preparación de las diluciones para la determinación de la CMI.



**Anexo 59.** Resultados de la determinación de la CMI para *E. coli*.



**Anexo 60.** Resultados de la determinación de la CMI para *S. aureus*.

