



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD

DEL CUSCO

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRIA EN CIENCIAS Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESIS

**COMPOSICION QUIMICA Y SU EFECTO ANTIMICROBIANO
DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus limon* (L) Osbeck SOBRE
CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas
Aeruginosa* Y *Escherichia coli***

**PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN
CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

AUTOR:

Br. ANA CECILIA TUPAYACHI PALOMINO

ASESOR:

DR. LEONCIO SOLIS QUISPE

CODIGO ORCID:

ORCID.ORG/0000-0001-9979-8590

Cusco – Perú
2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, asesor del trabajo de investigación/tesis titulado: ... COMPOSICIÓN QUÍMICA Y EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus limon* (L) Osbeck SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*

Presentad por: Ana Cecilia Tupayachi Palomino con Nro. de DNI: 23840918, para optar el título profesional/grado académico de Maestro. Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por dos veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del *Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC* y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 8%

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** la primera hoja del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 20 de diciembre de 2023



Firma

Dr. Leoncio Solís Quispe

Nro. de DNI 23877496

ORCID del Asesor Orcid.org/0000-0001-9979-8590

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid:27259:299997334 ✓

NOMBRE DEL TRABAJO

COMPOSICION QUIMICA Y SU EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE Citrus limon (L.) Osbeck SOBRE

AUTOR

ANA CECILIA TUPAYACHI PALOMINO

RECUENTO DE PALABRAS

18690 Words

RECUENTO DE CARACTERES

108968 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

118 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

1.9MB

FECHA DE ENTREGA

Dec 20, 2023 6:30 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Dec 20, 2023 6:33 AM GMT-5

● 8% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 8% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Base de datos de publicaciones
- Base de datos de trabajos entregados
- Material bibliográfico
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 12 palabras)
- Bloques de texto excluidos manualmente

Dedicatoria

A mi hijo Fabricio por ser mi fuente de inspiración, con la finalidad de enseñarle que el sacrificio del día a día tiene su recompensa como es el alcanzar un grado académico.

Agradecimiento

Muy orgullosa de poder hacer mención a todos a quienes agradezco el poder llegar al cumplimiento de esta meta tan anhelada que es mi maestría a través de este trabajo de investigación en honor a tal orgullo deseo expresar mi agradecimiento.

A Dios y a la Virgen de Guadalupe por darme la voluntad y la fuerza para seguir adelante con todo este proceso de realización personal.

A mi madre por ser un ejemplo de profesionalismo impecable y por empujarme constantemente a cumplir con esta meta.

A mi familia por ser un apoyo tan importante en este proceso.

A la Universidad San Antonio Abad del Cusco Facultad de ingeniería de procesos maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con maestros y doctores de excelencia que me dieron pautas para poder cumplir esta meta.

A mi tutor Leoncio Solis Quispe y Olga Cjuno Huanca por ser las personas que con gran paciencia y profesionalismo han sabido direccionar esta tesis.

A la empresa Fractal químicos por brindarme su tiempo y apoyo para el logro de mis objetivos.

Ana Cecilia

Índice General

Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Índice General.....	iv
Índice de Tablas	viii
Índice de Figuras.....	x
Índice de Anexos.....	xi
Índice de Fotografías.....	xii
Abreviaturas	xiv
Resumen.....	xv
Abstract.....	xvii
INTRODUCCION	1
CAPITULO I	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1.Situación problemática	3
1.2.Formulación del Problema.....	4
a.Problema General	4
b.Problemas específicos	4
1.2.Justificación de la Investigación	4
1.3.Objetivos de la Investigación.....	5

a.Objetivo General	5
b.Objetivos específicos.....	5
CAPITULO II	6
MARCO TEORICO CONCEPTUAL	6
2.1.Bases teóricas.....	6
2.1.1.Descripción botánica	6
2.1.2.Aceite esencial.....	7
2.2.3.Procesos de extracción	12
2.2.3.1.Espectrometría de Masas.....	14
2.2.3.2. Equipo Clevenger para destilación de aceites	15
2.2.3.3. Cepas	16
2.3.3.Actividad antimicrobiana	16
2.3.4.Escherichia coli	18
2.3.5.Staphylococcus aureus	19
2.3.6.Pseudomonas aeruginosa.....	21
2.3.Antecedentes empíricos de la investigación.....	23
CAPÍTULO III	31
HIPOTESIS Y VARIABLES	31
3.1.Hipótesis.....	31
3.2.Identificación de variables e indicadores	31
3.3.Operacionalización de variables.....	32

CAPITULO IV	34
METODOLOGÍA.....	34
4.1.Ámbito de estudio, localización política y geográfica.....	34
4.2.Tipo y nivel de investigación.....	35
4.3.Unidad de análisis	36
4.4.Población de estudio	36
4.5.Tamaño de muestra	36
4.6.Técnicas de selección de la muestra.....	36
4.7.Técnica Recolección de información	36
4.8.Equipos y Reactivos.....	37
4.9.Técnicas para demostrar la verdad o falsedad de las hipótesis planteadas...	48
CAPITULO IV	49
RESULTADOS Y DISCUSION	49
5.1.Análisis Físico - Químico del aceite esencial de <i>Citrus limón</i> (L) Osbeck	49
5.2.Solubilidad.....	49
5.3.Densidad	50
5.4.Índice de Refracción.....	51
5.5.Polarimetría	52
5.6.Índice de Carbonilo (Método de la hidroxilamina libre).....	52
5.7.Índice de Saponificación.....	52
5.8.Índice de Acidez	52

5.9. Perfil cromatógrafo de la composición química del aceite esencial <i>Citrus limón</i> (L) Osbeck por cromatografía de gases-espectrometría de masas se muestra en la figura (11)	53
5.10. Sensibilidad Antimicrobiana, del aceite esencial de <i>Citrus limón</i> (L.) frente a <i>Escherichia Coli</i> ATCC 8739	59
5.11. Sensibilidad Antimicrobiana, del aceite esencial de <i>Citrus limón</i> (L.) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	61
5.12. Sensibilidad Antimicrobiana, del aceite esencial de <i>Citrus limón</i> (L.) frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	64
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES	72
BIBLIOGRAFIA	73
ANEXO	81

Índice de Tablas

Tabla 1: Operacionalización de Variables	32
Tabla 2: Concentración del aceite esencial Citrus Limón (L) Osbeck.....	49
Tabla 3: Solubilidad del aceite esencial Citrus Limón (L) Osbeck	50
Tabla 4: Comparación de la solubilidad del aceite esencial con el CODEX	50
Tabla 5: Densidad del aceite esencial Citrus Limón (L) Osbeck.....	51
Tabla 6: Peso específico o densidad relativa del aceite esencial	51
Tabla 7: Índice de refracción del aceite esencial Citrus Limón (L) Osbeck.....	51
Tabla 8: Polarimetría – rotación óptica del aceite esencial Citrus limón (L) Osbeck	52
Tabla 9: Composición química del aceite esencial del aceite esencial Citrus limón (L). Osbeck.....	55
Tabla 10: Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana in vitro de aceite esencial de Citrus limón (L) Osbeck a diferentes concentraciones frente a Escherichia coli ATCC 8739	59
Tabla 11: Prueba de Kolmogorov-Smirnov para tamaño de halo de escherichia coli.	60
Tabla 12: Prueba ANOVA del tamaño promedio del halo acorde a los tratamientos frente a Escherichia Coli.	60
Tabla 13: Prueba Tukey tamaño de promedio halo y tratamiento frente a Escherichia coli.....	61
Tabla 14: Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana in vitro de aceite esencial de Citrus limón (L) Osbeck frente a Staphylococcus aureus ATCC 6538	61
Tabla 15: Prueba de Kolmogorov-Smirnov para tamaño de halo de. Staphylococcus aureus	63
Tabla 16: Prueba ANOVA del tamaño promedio del halo según los distintos	

tratamientos frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	63
Tabla 17: Prueba tukey tamaño de halo y tratamiento frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	63
Tabla 18: Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana in vitro de aceite esencial de Citrus limón (L) Osbeck frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.....	64
Tabla 19: Prueba de Kolmogorov-Smirnov para tamaño de halo de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	65
Tabla 20: Prueba ANOVA de tamaño promedio del halo acorde a los distintos tratamientos frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	65
Tabla 21: Prueba Tukey tamaño de halo y tratamiento según a los distintos tratamientos frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	66
Tabla 22: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	66
Tabla 23: Concentracion Mínima Inhibitoria (CMI) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	67
Tabla 24: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	68
Tabla 25: Concentración Mínima Bactericida (CMB) o efecto bactericida frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	68
Tabla 26: Concentración Mínima Bactericida (CMB) o efecto bactericida frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	69
Tabla 27: Concentracion Mínima Bactericida (CMB) o efecto Bactericida frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	70
Tabla 28: Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.....	97

Índice de Figuras

Figura 1: <i>Citrus limón</i> (L.) Osbeck.....	7
Figura 2: Estructuras de los componentes monoterpenicos	9
Figura 3: Estructuras de los componentes sesquiterpenos	10
Figura 4: Obtención de aceite de <i>Citrus limon</i> (L.).....	11
Figura 5: Equipo Clevenger.....	16
Figura 6: <i>Escherichia coli</i>	19
Figura 7: <i>Staphylococcus aureus</i>	21
Figura 8: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
Figura 9: Mapa de ubicación del distrito de Palma Real	35
Figura 10: Flujograma de la obtención de aceite esencial <i>Citrus limon</i> (L.)	39
Figura 11: Cromatograma de los picos correspondientes a cada uno de los componentes identificados por CG -EM.....	54
Figura 12: Comparación del tamaño promedio del halo según distintos tratamientos frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	59
Figura 13: Comparación de tamaño promedio del halo según distintos tratamientos frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	62
Figura 14: Comparación de tamaño promedio del halo según distintos tratamientos frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	64

Índice de Anexos

Anexo 1: Matriz de Consistencia	79
Anexo 2: Medios de verificación.....	76
Anexo 3: Aceites esenciales	77
Anexo 4: Saponificación.....	78
Anexo 5: Acid Value	79
Anexo 6: Registro fotográfico	80

Índice de Fotografías

Fotografía 1: Muestra recolectada	80
Fotografía 2: Picado y secado de las cáscaras de limón arrastre de vapor.....	80
Fotografía 3: Cáscara de <i>Citrus limón</i> L Osbeck.....	80
Fotografía 4: Equipo de destilación por Clevenger	80
Fotografía 5: Vial para guardar el aceite esencial a 4°C	81
Fotografía 6: Equipo de CG-E	81
Fotografía 7: Cromatograma en el equipo de CG-EM.....	81
Fotografía 8: Procedimientos microbiológicos.....	82
Fotografía 9: Cepas ATCC utilizadas.....	83
Fotografía 10: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 873	84
Fotografía 11: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	85
Fotografía 12: Efecto bacteriostático de aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (L.) frente a <i>S.</i> <i>aureus</i>	85
Fotografía 13: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	86
Fotografía 14: Concentración Mínima Bactericida (CMB) o Efecto Bactericida frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	86
Fotografía 15: Concentración Mínima Bactericida (CMB) o Efecto Bactericida frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	87
Fotografía 16: Concentración Mínima Bactericida (CMB) o Efecto Bactericida frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	87
Fotografía 17: Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana in vitro de aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (L.) frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	88
Fotografía 18: Halo de inhibición de aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (L.) frente a E.	88

Fotografía 19: Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana in vitro de aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (L.) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	91
Fotografía 20: Halo de inhibición de aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (L.) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	91
Fotografía 21: Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana in vitro de aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (L.) frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	94
Fotografía 22: Halo de inhibición de aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (L.) frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	94

Abreviaturas

(SAM) Sensibilidad antimicrobiana

(CMI) Concentración mínima inhibitoria

(CMB) Concentración mínima bactericida

(CODEX) Productos químicos alimentarios

(A.E.) aceite esencial

(ATCC) Cultivos de cepas tipo Americano

Resumen

Con el propósito de trascender en las investigaciones tecnológicas en productos naturales (aceites esenciales), el presente trabajo experimental, se realizó con el objetivo de determinar la composición química y el efecto antimicrobiano sobre tres bacterias patógenas tales como *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 para lo cual se extrajo el aceite esencial de la cáscara de *Citrus limón (L) Osbeck* por el método de hidrodestilación en trampa de Clevenger, se determinó la concentración que fue de 0,315% (v/p), en las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial se tiene que es soluble en disolventes ligeramente polares, la densidad (20°C) fue de 0,8707 g/mL, su índice de refracción (20°C) 1,4783, la rotación óptica 59,3 grados/dm/g/mL, índice de carbonilo 2,43 mg KOH/g de muestra, índice de saponificación menor a 0,01 mg KOH/g de muestra y su índice de acidez 7,55 mg KOH/g de muestra, en la determinación de la composición química de *Citrus limón (L) Osbeck* según la cromatografía de gases-espectrometría de masas se identificaron 28 componentes que representan el 96,13% del total de aceites volátiles donde el limoneno es el componente de mayor porcentaje seguido del γ -terpineno con 12,41%, β -pineno 12,3%, p-cimeno 10,65%. Los efectos antimicrobianos sobre las tres bacterias patógenas en la CMB o el efecto bactericida frente a *Escherichia coli* ATCC 8739 se presentó a una dilución de 1/2 es decir 855g/mL a las 24 y 48 horas, en *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 se presentó a una dilución de 1/4 es decir 285 mg/mL a las 24 y 48 horas, frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, se presentó a una dilución de 1/4 es decir 855g/mL a las 24 y 48 horas, demostrando que el aceite esencial *Citrus limón (L) Osbeck* es antimicrobiano.

Palabras Clave: Efecto antimicrobiano, Cepas, Aceite esencial,
Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

Abstract

With the purpose of transcending technological research in natural products (essential oils), the present experimental work was carried out with the objective of determining the chemical composition and the antimicrobial effect on three pathogenic bacteria such as *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 for which the essential oil was extracted from the peel of *Citrus lemon* (L) Osbeck. By the hydrodistillation method in Clevenger trap, the concentration was determined, which was 0.315% (v/p), in the physicochemical properties of the essential oil it is soluble in slightly polar solvents, the density (20°C) was of 0.8707 g/mL, its refractive index (20°C) 1.4783, optical rotation 59.3 degrees/dm/g/mL, carbonyl index 2.43 mg KOH/g of sample, saponification index less than 0.01 mg KOH/g of sample and its acidity index 7.55 mg KOH/g of sample, in the determination of the chemical composition of *Citrus lemon* (L) Osbeck according to gas chromatography-mass spectrometry, 28 components were identified that represent 96.13% of the total volatile oils where limonene is the component with the highest percentage followed by γ -terpinene with 12.41%, β -pinene 12.3%, p-cymene 10.65%. The antimicrobial effects on the three pathogenic bacteria in the CMB or the bactericidal effect against *Escherichia coli* ATCC 8739 was presented at a dilution of 1/2, that is, 855g/mL at 24 and 48 hours, in *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 It was presented at a dilution of 1/4, that is, 285 mg/mL at 24 and 48 hours, compared to *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, it was presented at a dilution of 1/4, that is, 855g/mL at 24 and 48 hours, demonstrating that *Citrus lemon* (L) Osbeck essential oil is antimicrobial.

Keywords : Antimicrobial effect, Cepas, Strains essential oil,
Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

INTRODUCCION

El proceso de conservación de alimentos se da a partir de la necesidad de prolongar la vida útil, exenta de actividad microbiana y sin afectar las características sensoriales. En esta dirección, es justificable el uso de agentes antimicrobianos en la industria alimentaria, tal como el aceite esencial de limón que ayuda a prevenir hongos y bacterias en los alimentos. (Sánchez *et al.*, 2008)

Actualmente la salud pública se ve afectada, debido al irracional uso de bactericidas químicos como preservantes en alimentos de consumo masivo tales como las frutas, los vegetales, productos elaborados como los embutidos y también productos de origen animal. En contraposición, ha surgido cierta predisposición como agente natural antimicrobiano, el uso de aceites esenciales y en especial de los cítricos (Silva , 2015).

Los aceites esenciales han demostrado tener propiedades antimicrobianas lo que los hace ideales para ser utilizados como conservantes naturales en la industria alimentaria. En particular el aceite esencial de *Citrus limon* (L) Osbeck, debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, son patógenas comunes que pueden causar infecciones en humanos; frente a esto, el *Citrus limon* (L) Osbeck es una fuente importante de compuestos bioactivos por consiguiente beneficios para la salud humana. (Argote *et al.*, 2017)

Algunos autores como Vignola *et al.* (2020), evaluaron el efecto de los aceites esenciales en bacterias benéficas, patógenas y alterantes de alimentos, concluyendo que los aceites esenciales de las cáscaras y hojas secas de limón, eucalipto presentaron un efecto bactericida en las cepas analizadas debido a

que no hubo crecimiento de microorganismos, en comparación con los aceites esenciales de cáscara de naranja y mandarina que presentaron poder antimicrobiano nulo frente a las cepas bacterianas.

En este trabajo se estudió el aceite del *Citrus limón* (L) Osbeck procedente de la Región Cusco-Provincia la Convención-Distrito Echarate-Illapani a 780 m y sus efectos antibacterianos sobre tres bacterias patógenas tales como *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

El aceite esencial del *Citrus limón* (L) Osbeck, se obtuvo por el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger a partir de la cáscara seca. De las propiedades fisicoquímicas, se determinaron la solubilidad en distintos solventes entre apolar y polar, la densidad, índice de refracción, rotación óptica. Los resultados dieron valores contrastables con el CODEX (2004) y confirmando un aceite esencial de calidad estándar con alto contenido de limoneno.

La CMB o el efecto bactericida frente a *Escherichia coli* se presentó a una dilución de 1/2 es decir 855 g/mL a las 24 y 48 horas, en *Staphylococcus aureus* se presentó a la dilución de 1/4 es decir a 285 mg/mL a las 24 y 48 horas y para *pseudomonas aeruginosa* se presentó a una dilución de 1/4 es decir 285mg/mL a las 24 y 48 horas. Por tanto el aceite esencial *citrus limón* (L) Osbeck tiene efecto antimicrobiano frente a las tres cepas ATCC utilizadas en esta investigación.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Situación problemática

La Región Cusco, por sus características agroecológicas posee un alto potencial para el cultivo de *Citrus limón* (L) Osbeck de la Región Cusco -Provincia la Convención- Distrito Echarate-Illapani situada a una altitud de 780 metros.

En la investigación se busca reemplazar los bactericidas químicos utilizados en alimentos; por productos de origen natural como es el *Citrus limón* (L.) Osbeck obteniendo su aceite esencial, investigaciones científicas indican que ha demostrado tener un efecto inhibidor del crecimiento de bacterias tanto Gram (+) como Gram (-), por su enorme variedad de metabolitos secundarios producido por esta planta (Fancello *et al.*, 2020, pág. 22).

El aceite esencial de *Citrus limón* (L) Osbeck, ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes, lo que lo hace ideal para su uso en la industria alimentaria. El mecanismo de acción de los aceites esenciales del citrus es aún desconocido, hasta el momento se ha investigado la utilización de estos aceites esenciales en algunos alimentos, tales como pescados, carnes, la aplicación de citral y linalool redujo la micro flora en piel, intestinos y branquias de pescado (carpas) conservada a 20 °C por 48 horas (Montalvo y Rojas, 2021).

La bibliografía especializada no reporta información acerca del efecto antimicrobiano del aceite esencial del *Citrus limón* (L) Osbeck procedentes de la Región Cusco - Provincia la Convención - Distrito Echarate – Illapani - Palma Real sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* razón por la cual la presente investigación plantea determinar la composición química del

aceite esencial *Citrus limón* (L) Osbeck

1.2. Formulación del Problema

a. Problema General

¿Cuál es la composición química del aceite esencial del *Citrus limón* (L) Osbeck y su efecto antimicrobiano sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*?

b. Problemas específicos

1. ¿ Será posible obtener una concentración favorable del aceite esencial *Citrus limón* (L) Osbeck, para determinar su composición química?
2. ¿Cuáles son las características fisicoquímicas del aceite esencial del *Citrus limón* (L) Osbeck?
3. ¿Cuál será la composición del aceite esencial *Citrus limón* (L.) Osbeck.
4. ¿Cuál será su efecto antimicrobiano sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*?

1.2. Justificación de la Investigación

Los aceites esenciales han sido reconocidos durante mucho tiempo por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, insecticidas y antioxidantes. Son ampliamente utilizados en la industria alimentaria. Los aceites esenciales y sus componentes muestran actividades prometedoras contra muchos patógenos transmitidos por los alimentos y microorganismos de deterioro. El propósito de esta investigación es proporcionar una visión general de la eficacia antimicrobiana. El conocimiento de la composición química y el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Citrus limón* (L) Osbeck, es importante para disminuir el uso de aditivos sintéticos en los alimentos, por lo que la industria de alimentos está tratando de cambiarlos por aditivos naturales y sin modificar su perfil sensorial.

Los metabolitos secundarios de origen vegetal, constituyen una importante línea de investigación en el control de microorganismos en los alimentos, la cual debe ser sustentada y comprobada de forma científica con la finalidad de aportar al conocimiento científico sobre el efecto antimicrobiano.

1.3. Objetivos de la Investigación

a. Objetivo General

Determinar la composición química y su efecto antimicrobiano del aceite esencial del *Citrus limón (L.) Osbeck* sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

b. Objetivos específicos

1. Determinar la concentración del aceite esencial del *Citrus limón (L.) Osbeck* por el método de hidrodestilación en trampa de cleverger
2. Caracterizar las propiedades físico-químicas del aceite esencial de *Citrus limón (L.) Osbeck*, considerando parámetros: solubilidad, densidad, índice de refracción, polarimetría, índice de carbonilo, índice de saponificación y índice de acidez.
3. Determinar la composición química por cromatografía de gases-espectrometría de masas de la fracción volátil del aceite esencial *Citrus limón (L.) Osbeck*.
4. Evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Citrus limón (L.) Osbeck* a diferentes concentraciones sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, comparados con patrones de trimetropin, oxacilina, ampicilina y ciprofloxacino, a través de la concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida y sensibilidad antimicrobiana por el método de pozo excavado.

CAPITULO II

MARCO TEORICO CONCEPTUAL

2.1. Bases teóricas

2.1.1. Descripción botánica

***Citrus limón* (L) Osbeck.** Es originario de Indo-malayo, donde posteriormente fue llevado a la India extendiéndose a nivel mundial y por toda Latinoamérica desde los viajes de Cristóbal Colón. Es una especie híbrida del género *Citrus*. Es originario de Asia y fue desconocido por griegos y romanos, siendo mencionado por primera vez en el libro sobre agricultura Nabathae en siglo III y IV. El cultivo fue desarrollado en occidente después de la conquista árabe a España, extendiéndose por todo el litoral mediterráneo donde se cultiva, debido a la benignidad del clima, para consumo interno y de exportación. (EcuRed, 2014)

Citrus limón, comúnmente conocido como limón, es una especie de planta perenne, se caracteriza por tener frutos comestibles, con una pulpa ácida y jugosa, y una piel gruesa y rugosa de color verde amarillento. (Hynniewta *et al.*, 2014)

Es un arbusto o árbol pequeño que puede alcanzar hasta 6 metros de altura, la corteza de su tronco es grisácea, las ramas son angulosas o redondeadas. Sus hojas alternas, relativamente pequeñas en comparación con otros cítricos (5-7 cm de longitud), presentan en la superficie numerosas glándulas transparentes que encierran abundantes aceites esenciales; esto les confiere un peculiar aroma a las hojas del limón, son ovales de color verde oscuro y tienen un tamaño de 5 a 15 cm de largo. Las flores son solitarias o se presentan en grupos de 2 o 3, de color blanco o ligeramente rosado, y tienen un diámetro de 2.5 a 3 cm.

El fruto contiene elevado contenido de ácido cítrico y vitamina C o ácido

ascórbico. Florece durante casi todo el año, Para su cultivo se requiere de zonas tropicales así mismo en su suelo con una humedad de 90% para mantenerlos en un ambiente fresco, estas condiciones prolongan su estadio de vida entre medio año aproximadamente, ya que si se expone a temperaturas bajas hace que el fruto pierda su jugosidad. Su uso es a nivel alimentario, propiedades estéticas, como antibacteriano (Marreros, 2021).

Figura 1: *Citrus limón* (L.) Osbeck



Fuente: The University of Arizona (2016)



Fuente: Oakman (2020)

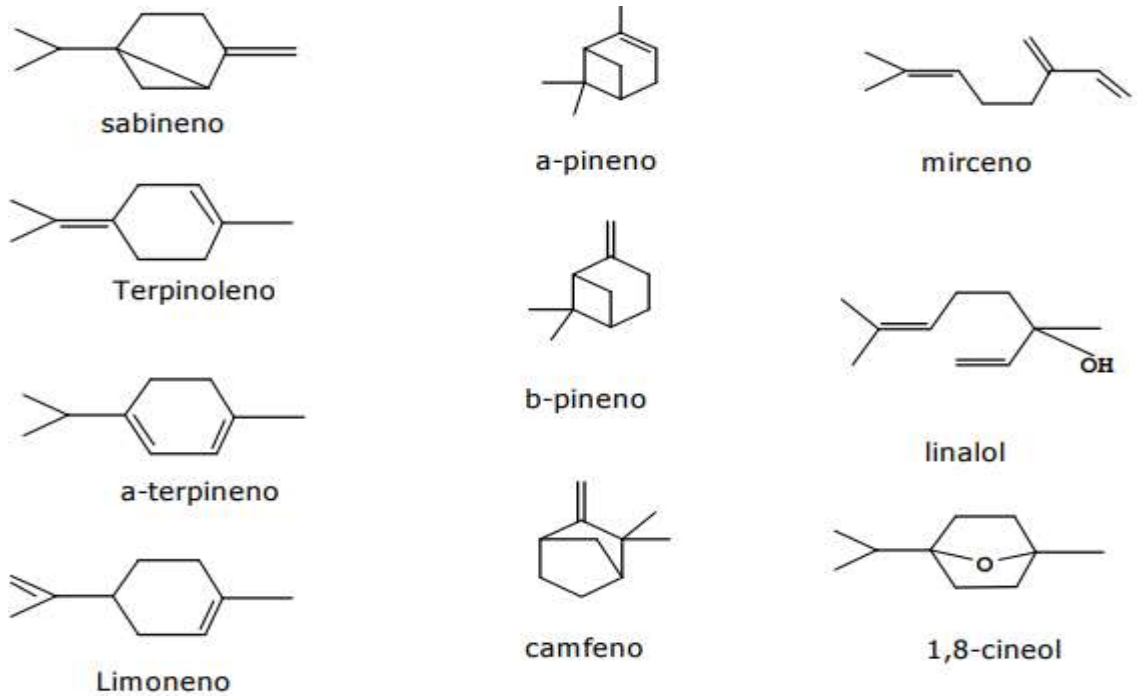
2.1.2. Aceite esencial

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, que contienen sustancias responsables del aroma de las plantas, son importantes en la industria cosmética, perfumería, alimentos y farmacéutica, debido a su aroma fresco y agradable. Tienen más de 100 componentes así tenemos a los alifáticos que son, alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos compuestos aromáticos ampliamente distribuida en los vegetales (Rodríguez *et al.*, 2012).

Los aceites esenciales se pueden extraer de los vegetales mediante varios procedimientos destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles y con fluido supercrítico. Los aceites esenciales tanto los monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos se les encuentra en forma libre, y los que están ligados a carbohidratos, se considera que son los precursores inmediatos del aceite esencial, sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes generando oligómeros de naturaleza indeterminada, los aceites esenciales de cítricos, son compuestos aromáticos volátiles, generalmente presentes en las cáscaras de los cítricos en una concentración promedio de 0.6% y 3.8%. (Rodríguez *et al.*, 2012)

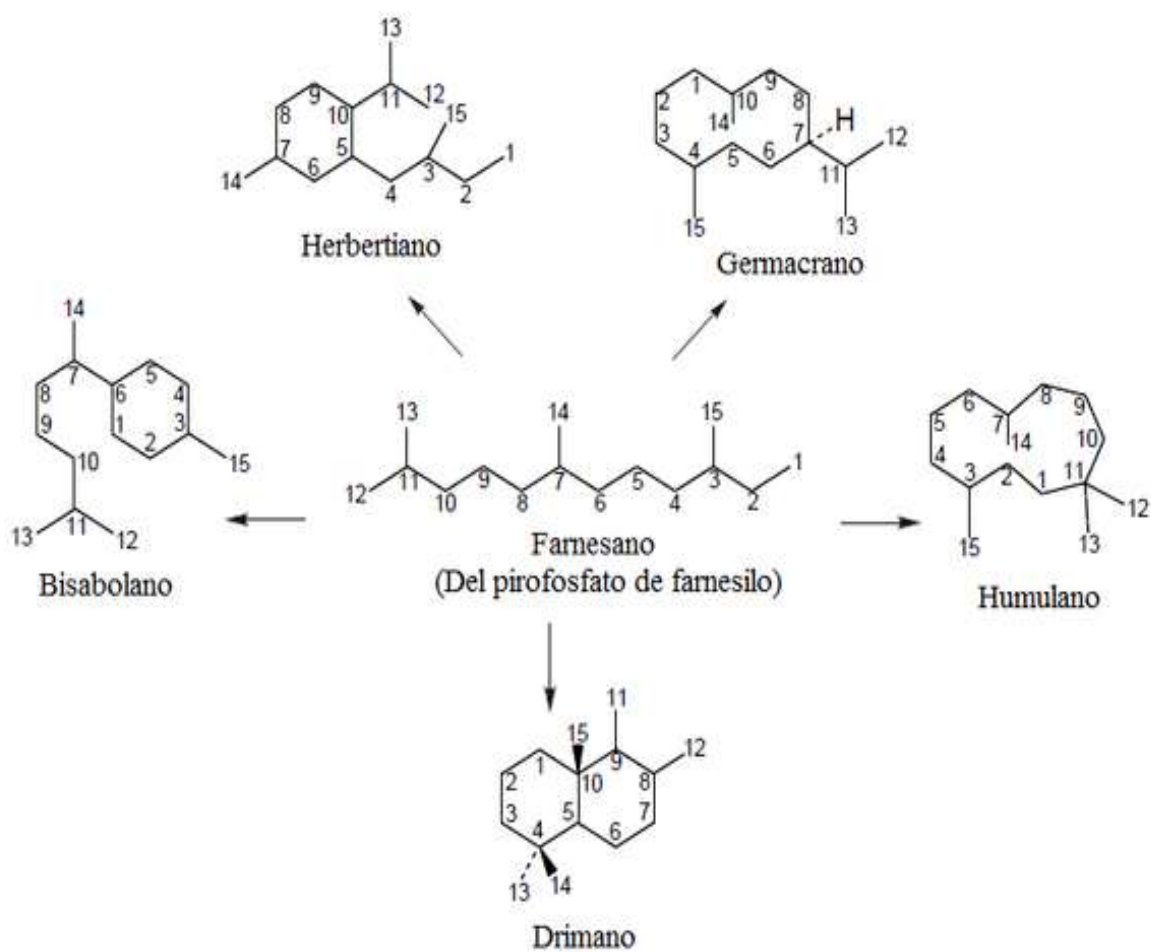
Las cáscaras de los cítricos están compuestas por una capa blanca interior llamada albedo y una colorida piel exterior llamada flavedo. Los aceites esenciales se encuentran principalmente en el flavedo y están ausentes o presentes en cantidades mínimas en el albedo

Figura 2: Estructuras de los componentes monoterpénicos



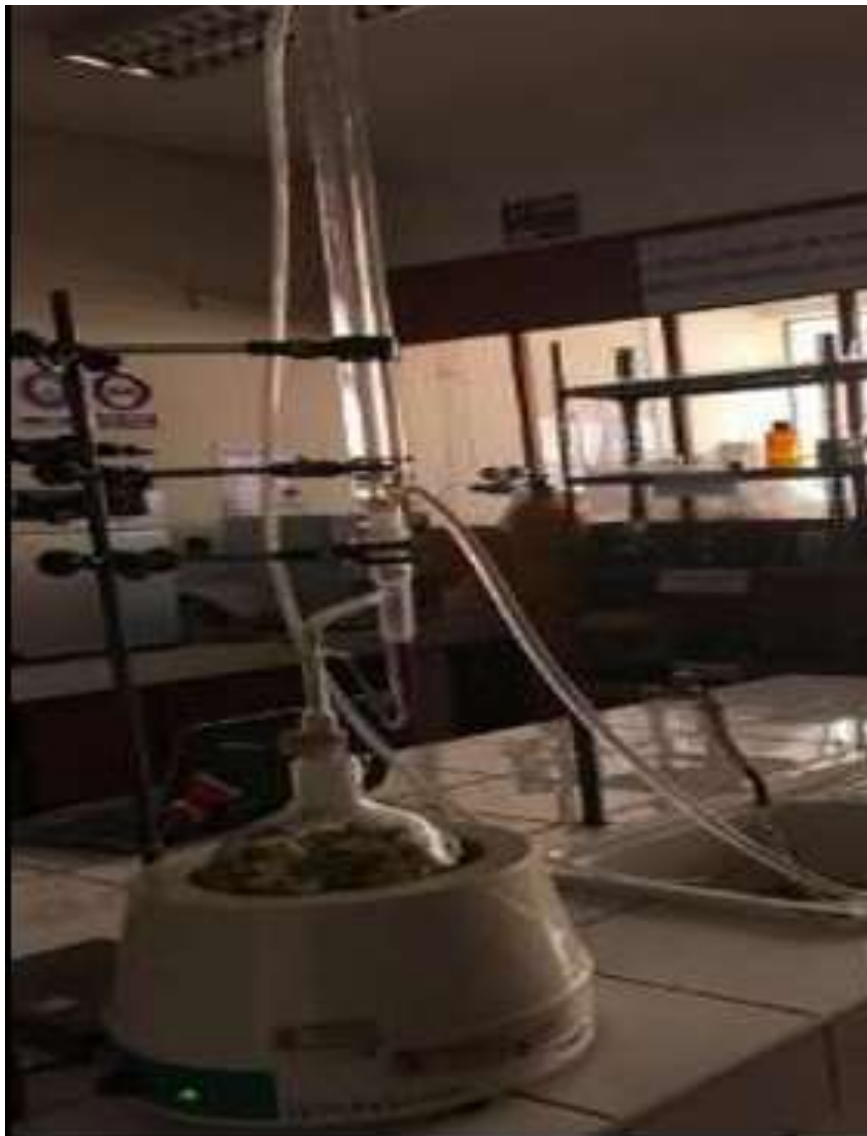
Fuente: D. Sabillon (2002)

Figura 3: Estructuras de los componentes sesquiterpenos



Fuente: D. Sabillon (2002)

Figura 4: *Obtención de aceite de Citrus limon (L.)*



Fuente: Obtenido en el laboratorio de fitoquímica – Departamento de Química UNSAAC.

2.2.3. Procesos de extracción

Los aceites esenciales se pueden extraer mediante diferentes métodos como: prensado, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos súper críticos.

Prensado. El material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite y luego ser recolectado y filtrado.

Extracción con solventes volátiles. La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes como alcohol o cloroformo, se extrae el aceite esencial con otras sustancias como grasas y ceras obteniéndose al final una esencia impura.

Enfleurage. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales, pero tiene bajo rendimiento y es muy costoso.

Extracción con fluidos supercríticos. El material vegetal es cortado y molido, se introduce en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado súper crítico las esencias son solubilizadas y arrastradas el fluido súper crítico actúa como solvente extractor y es eliminado por descompresión hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente.

Cromatografía de gases



Fuente: Equipo de Cromatografía de gases-espectrometría de masas, Obtenido en el laboratorio de fitoquímica – Departamento de Química UNSAAC.

La cromatografía de gases es una técnica que se caracteriza por conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Así mismo, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (Gas Chromatography) y MS (Mass Spectrometry) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas. (Gutiérrez y Droguet, 2002)

La cromatografía de gases es utilizada para la separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles, la muestra es vaporizada e introducida en un flujo de gas apropiado denominado fase móvil o gas de arrastre, este flujo de gas con la muestra vaporizada pasa por un tubo que contiene la fase estacionaria (columna cromatográfica) donde ocurre la separación de la mezcla, cuanto más volátiles la sustancia (mayor presión de vapor), mayor es su tendencia a permanecer vaporizada más rápidamente avanza por el sistema, las sustancias separadas salen por la columna disueltas en el gas de arrastre y pasan por el detector dispositivo que genera una señal eléctrica proporcional a la cantidad de material diluido, el registro de esta señal está en función del tiempo en el cromatograma en donde las sustancias aparecen como picos con áreas proporcionales a sus masas lo que posibilita el análisis cuantitativo. El gas de arrastre está contenido en cilindros de

alta presión (He, N₂, H₂), este es controlado constantemente durante el análisis, el sistema de introducción de la muestra es el inyector (vaporizador) es una pieza de metal conectada a la columna cromatográfica y a la alimentación del gas de arrastre, esta pieza tiene un orificio con microjeringas. El inyector debe calentarse a temperatura mayor al punto de ebullición de los componentes de la muestra, para que la muestra se volatilice completamente y sea introducida en la columna en forma de un segmento estrecho para evitar alargamiento en los picos por lo que debe volatilizarse rápidamente, la cantidad de muestra inyectada depende de la columna y del detector empleado, los volúmenes de inyección deben ser del orden de micro litros, la temperatura se controla estrictamente para asegurar la reproducibilidad del análisis. El tiempo de retención, es el tiempo transcurrido entre la inyección y el máximo del pico cromatográfico, la fase estacionaria es la variable más importante en la optimización de la selectividad (Perez, 2003).

2.2.3.1. Espectrometría de Masas

Es una técnica micro analítica usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de las moléculas, requiere cantidades pequeñas de muestra y obtiene información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito. se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, una vez obtenidos estos iones se separan de acuerdo con su masa y su carga y finalmente se detectan por un dispositivo adecuado, los procesos que tienen lugar en un espectrómetro de masas, son de naturaleza química. En consecuencia, la presencia y abundancia en el espectro de determinados tipos de iones, identificables a partir de su masa será función de la estructura química de cada compuesto, el espectrómetro de masas es capaz de vaporizar sustancias de

volatilidades muy diferentes y originar iones a partir de las moléculas neutras en fase gaseosa y separarlos, luego detecta los iones formados y registra la información (Mehlenbacher y Lasa, 1979)

La muestra es fragmentada e ionizada obteniendo un registro para cada especie su característica del espectrómetro de masas es de alta sensibilidad, la cantidad de muestra es pequeña, su elevada resolución permite el análisis de mezclas siempre que sean introducidas por el cromatógrafo de gases, dentro del espectrómetro de masas las moléculas son bombardeadas por electrones o iones, un ion formado se fragmenta y estos son separado magnéticamente de acuerdo con las masas moleculares. El espectro de masas de un compuesto puro ofrece valiosa información para fines de identificación cualitativa siendo la determinación del peso molecular lo más importante (Perez, 2003).

2.2.3.2. Equipo Clevenger para destilación de aceites

El equipo clevenger está fabricado en vidrio borosilicato ideal para uso en proceso de destilación de aceites esenciales. Es un método de extracción de aceites. Su funcionamiento se basa en someter a temperatura constante la muestra hasta alcanzar el punto de ebullición. Esto se logra por medio de una manta de calentamiento. Una vez comienza evaporarse, se condensa en la parte superior gracias al condensador. La muestra condensada baja por un ducto hacia la bureta de extracción provista de una llave. El agua retorna al matraz por un canal alterno. Posteriormente terminada la destilación, se puede medir el aceite separado gracias a la escala que el aparato clevenger dispone en la bureta. (Gil y Casas, 2023)

Figura 5: Equipo Clevenger



Fuente: Aceq laboratorios (Aceq Laboratorios, s.f.)

2.2.3.3. Cepas

Grupo de organismos que pertenecen a la misma especie, pero que comparten ciertas características genéticas que no se encuentran en otros miembros de dicha especie. Los microorganismos, como virus, bacterias y hongos, presentan muchas cepas dentro de una misma especie (Instituto Nacional del Cáncer , s.f.).

2.3.3. Actividad antimicrobiana

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas, de acuerdo a sus características químicas son mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos y son conocidos por su actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias y mohos. La hidrofobicidad de los aceites esenciales les permite incorporarse a los lípidos de la membrana bacteriana, ocasionando trastornos en su estructura y permeabilidad, dando lugar a la fuga de iones y otros compuestos. (Hernández, 2014)

Existen varios métodos para determinar el efecto antimicrobiano de aceites

esenciales de plantas en microorganismos, entre ellos tenemos:

Método de dilución en agar: Este método implica la preparación de diluciones seriadas de un aceite esencial en agar estéril, seguido de la siembra de microorganismos en la placa de agar. Después de la incubación, se evalúa la inhibición del crecimiento microbiano en función de la concentración del aceite esencial. Este método es fácil de realizar y proporciona información cuantitativa sobre la actividad antimicrobiana. (Khan et al., 2019)

Método de difusión en agar: En este método, un disco de papel estéril impregnado con una cantidad conocida de aceite esencial se coloca en una placa de agar sembrada con microorganismos. Después de la incubación, se mide el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento alrededor del disco de papel, lo que y proporciona indica la actividad antimicrobiana del aceite esencial. Este método es fácil de realizar, pero solo proporciona información cualitativa (Khan et al., 2019).

Método de micro dilución en caldo: En este método, se preparan diluciones seriadas de un aceite esencial en caldo estéril, seguido de la adición de microorganismos al caldo. Después de la incubación, se evalúa la inhibición del crecimiento microbiano en función de la concentración del aceite esencial. Este método es útil para la evaluación de la actividad antimicrobiana en solución líquida información cuantitativa (Cvetkovikj *et al.*, 2015).

Método de tiempo de muerte: Este método implica la exposición de microorganismos a una concentración conocida de aceite esencial durante un período de tiempo determinado. Después de la exposición, se mide el número de células viables restantes. Este método proporciona información sobre la velocidad de acción del aceite esencial en el microorganismo (Carson *et al.*, 2015).

2.3.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa que forma parte de la microbiota normal del intestino humano y de los animales. Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* pueden causar infecciones en humanos, como infecciones del tracto urinario, meningitis y sepsis (Croxen *et al.*, 2013). Además, *E. coli* ha desarrollado resistencia a múltiples antibióticos, ocasionando un aumento en la mortalidad y morbilidad de las infecciones asociadas a esta bacteria (Gajdács, 2019).

La resistencia de *E. coli* a los antibióticos se debe en gran parte a la presencia de genes de resistencia, que pueden ser transmitidos a otras bacterias a través de elementos móviles como los plásmidos o los integrones (Gajdács, 2019). Además, *E. coli* puede adquirir resistencia a los antibióticos a través de mutaciones en sus genes, lo que puede ocurrir de manera espontánea o como resultado de la exposición a los antibióticos (Croxen *et al.*, 2013).

La resistencia antimicrobiana de *E. coli* es un problema de salud pública a nivel global. En un estudio realizado por Croxen *et al.* (2013), se evaluó la prevalencia de resistencia a los antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes hospitalizados en diferentes países. Los resultados mostraron que la resistencia a los antibióticos era común en todas las regiones evaluadas, siendo la resistencia a las fluoroquinolonas y a las cefalosporinas de tercera generación las más prevalentes. En otro estudio, Gajdács (2019), la resistencia de *E. coli* a los antibióticos se da por la prescripción inapropiada de antibióticos en la práctica clínica, así como la falta de nuevas terapias antimicrobianas.

Se encontró que el aceite esencial de *citrus limón* tenía un efecto

bacteriostático y bactericida contra *E. coli*, lo que significa que inhibía el crecimiento de la bacteria y la mataba (Cvetkovikj *et al.*, 2015).

Figura 6

Escherichia coli



Fuente: infobioquimica.org

2.3.5. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva, esférico, con un diámetro de 0,5 – 1,5 μm , se encuentran aisladas en pares o formando racimos. No forman esporas, no tienen flagelos, pueden ser aerobios o anaerobios facultativos. fermentan carbohidratos y producen pigmentos de color blanco, amarillo o dorado y algunas cepas presentan una capa de polisacáridos extracelulares, forma parte de la microbiota normal de la piel y las mucosas en los seres humanos. Sin embargo, esta bacteria puede causar infecciones graves en diferentes órganos y sistemas, como la piel, el aparato respiratorio, el tracto urinario y el sistema nervioso central (Tong *et al.*, 2015). Además, *S. aureus* ha desarrollado resistencia a múltiples antibióticos, ocasionando un aumento en la mortalidad y morbilidad de las infecciones asociadas a esta bacteria (Gajdács, 2019).

La resistencia de *S. aureus* a los antibióticos se debe en gran parte a la producción de enzimas como la β -lactamasa y la penicilinas, que inactivan a los antibióticos β -lactámicos como las penicilinas y las cefalosporinas (Tong *et al.*, 2015). Además, *S. aureus* puede adquirir resistencia a otros antibióticos, como los macrólidos, las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos, a través de mutaciones o de la adquisición de genes de resistencia mediante elementos móviles como los plásmidos o los integrones (Gajdács, 2019; Tong *et al.*, 2015).

La resistencia antimicrobiana de *S. aureus* es un problema de salud pública a nivel global. En un estudio realizado por Tong *et al.* (2015), se evaluó la prevalencia de resistencia a los antibióticos en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes hospitalizados en diferentes países. Los resultados mostraron que la resistencia a los antibióticos era común en todas las regiones evaluadas, siendo la resistencia a la penicilina y a las fluoroquinolonas las más prevalentes. En otro estudio, Gajdács (2019) revisó la literatura científica sobre la resistencia de *S. aureus* a los antibióticos y encontró que el uso inapropiado de antibióticos en la práctica clínica, así como la falta de nuevas terapias antimicrobianas, eran factores que contribuían a la propagación de la resistencia.

El aceite esencial de *citrus* limón ha demostrado tener un efecto antimicrobiano significativo contra *Staphylococcus aureus*, una bacteria patógena que puede causar infecciones graves en humanos. En un estudio, se encontró que el aceite esencial de *citrus limón* inhibía el crecimiento de *Staphylococcus aureus* de manera dosis-dependiente, siendo más efectivo en concentraciones más altas (Pérez y Gomez, 2012).

Figura 7

Staphylococcus aureus



Fuente: Medicina y salud publica

2.3.6. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa que se encuentra comúnmente en el suelo, el agua y los ambientes hospitalarios. Esta bacteria puede causar infecciones graves en humanos, especialmente en pacientes con sistemas inmunológicos comprometidos, como aquellos con fibrosis quística o quemaduras graves (Gellatly y Hancock, 2013). Además, *P. aeruginosa* ha desarrollado resistencia a múltiples antibióticos, lo que ha llevado a un aumento en la mortalidad y morbilidad de las infecciones asociadas a esta bacteria (Gajdács, 2019).

La resistencia de *P. aeruginosa* a los antibióticos se debe en gran parte a la capacidad de esta bacteria para desarrollar mutaciones en sus genes y adquirir genes de resistencia a través de elementos móviles como los plásmidos (Gellatly y Hancock, 2013). Además, *P. aeruginosa* puede producir mecanismos de resistencia intrínsecos a ciertos antibióticos, como las β -lactamasas y las bombas de eflujo (Gajdács, 2019).

La resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa* es un problema de salud pública a nivel global. En un estudio realizado por *Gajdács (2019)*, se evaluó la prevalencia de resistencia a los antibióticos en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes hospitalizados en diferentes países. Los resultados mostraron que la resistencia a los antibióticos era común en todas las regiones evaluadas, siendo la resistencia a las fluoroquinolonas y a las carbapenemasas las más prevalentes. En otro estudio, *Gellatly y Hancock (2013)* revisaron la literatura científica sobre la resistencia de *P. aeruginosa* a los antibióticos y encontraron que la exposición prolongada a los antibióticos en los pacientes, así como la selección natural en el ambiente hospitalario, eran factores que contribuían a la propagación de la resistencia.

El aceite esencial de *citrus limón* también ha demostrado tener actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria que puede causar infecciones respiratorias, de la piel y del tracto urinario. En un estudio, se encontró que el aceite esencial de citrus limón tenía un efecto bacteriostático y bactericida contra *P. aeruginosa* (*Khan et al., 2019*).

Figura 8

Pseudomonas aeruginosa



Fuente: revista UNAM

2.3. Antecedentes empíricos de la investigación

Urrunaga (2022) extrajo aceite esencial de la cáscara de *Citrus jambhiri* (limón rugoso) por el método de destilación por arrastre de vapor de agua y se cuantificó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas presentando en su composición monoterpenos hidrocarbonados en un 76.5%, siendo los más abundantes el limoneno (37,7%), el β -pineno (25,1%) y el E- β -ocimeno (5,6%), en tanto que, los monoterpenos oxigenados constituyen un 15%, siendo los mayoritarios el citronelal (4,9%) y el linalool (4,1%) y entre los sesquiterpenos hidrocarbonados destaca el β -cariofileno en un 2,8%. Dentro de sus propiedades fisicoquímicas se encontró una densidad (20 °C) de 0,844 g/mL \pm 0,02; índice de refracción (20 °C) de 1,472 \pm 0,01 y un pH de 4,7 \pm 0,01.

Singh (2021) determinó la composición química y la bioactividad de la cascara de los cítricos donde los principales componentes fueron los monoterpenos como limoneno identificado en la cáscara de diferentes especies de cítricos (92.52–97.3 %) y β - pineno (1.37–1.82), se informa que estos funcionan como antioxidantes, antiinflamatorios, analgésicos, antimicrobianos y agentes anticancerígenos, por esta razón se pueden utilizar como componentes funcionales y conservantes para el desarrollo de nuevos productos alimenticios nutricionalmente seguros. Por lo que se informa que es un importante inhibidor del crecimiento de microbios en los alimentos.

Montalvo y Rojas (2021) evaluaron el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de eucalipto y limón, y se demostró a través de análisis fisicoquímicos y organolépticos el proceso de conservación que tienen ambos aceites al agregarlo a la carne de cerdo molida sobrepasando el periodo de tiempo de vida útil en refrigeración. Se determinó en diferentes concentraciones de aceite esencial de eucalipto y limón, encontrando la mejor concentración en aceite esencial de limón y

eucalipto al 5% y 6 % respectivamente.

Vignola *et al.* (2020) demostraron el poder antibacteriano selectivo de los aceites de limón, naranja, mandarina, laurel, eucalipto y berro contra bacterias benéficas (*Lactobacillus plantarum* es147 y ATCC 8014), patógenas (*Escherichia coli* ATCC 25922) y alterante de alimentos (*Leuconostoc mesenteroi* des MS1). El aceite esencial se obtuvo de las cáscaras y de hojas. Los aceites esenciales se obtuvieron por arrastre con vapor de agua, de utilizo un equipo de escala semilaboratorio por 90 min desde que comenzó la condensación. Los aceites esenciales se mantuvieron en un frasco color caramelo y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. En el análisis de sensibilidad el AELa (aceite esencial de laurel) y AEB (aceite esencial de berro) fueron más efectivos para inhibir *Escherichia coli* ATCC 25922 que al resto de las bacterias tal como se observa en los diámetros de inhibición de 18,33 mm y 16,67 mm respectivamente. El AELa generó significativamente mayor halo de inhibición en *Escherichia coli* ATCC 25922 que en el resto de las cepas; mientras que el AEN (aceite esencial de naranja) contra *Escherichia coli* ATCC 25922 solo generó un halo de 5,5 mm de promedio. El AEB presentó significativamente mayor actividad antimicrobiana contra la bacteria patógena (*Escherichia coli* ATCC 25922) y la alterante de alimentos (*Leuconostoc mesenteroides* MS1), que contra ambas cepas benéficas (*Lactobacillus plantarum* ES147 y ATCC 8014). En cuanto a los AEN, AEM (aceite esencial mandarina) y AEE (aceite esencial eucalipto) no se evidenciaron diferencias significativas en la actividad antimicrobiana entre las cepas analizadas. Se encontraron diferencias significativas entre los diámetros de halos de inhibición para AEL y AELa ($p=0,05$) las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas eran igualmente sensibles a los aceites esenciales de cítricos como el limón, la mandarina y la naranja.

Raspo *et al.* (2020) determinaron la actividad antioxidante y antimicrobiana de los aceites esenciales de cítricos Pomelo (*Citrus paridisi*), limón (*Citrus lemon*), mandarina o tangerinas (*Citrus reticulata*) de Argentina y de Estados Unidos, las cascaras de los cítricos fueron molidos y sometidos a hidrodestilación con el aparato de Clevenger para obtener sus aceites esenciales, para su composición, se llevó a cabo la cromatografía de gases-espectrometría de masas, el limoneno se encontró como el compuesto principal. Se realizó pruebas para actividades antioxidantes de los aceites esenciales. La actividad antimicrobiana se probó contra *Leuconostoc mesenteroides* MS1, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Lactobacillus plantarum* es 147 y ATCC 8014. El aceite esencial de mandarina de EE.UU. mostró la mayor capacidad antioxidante en diferentes ensayos. Los aceites esenciales de toronja y limón mostraron una actividad antimicrobiana consistentemente fuerte contra todas las bacterias probadas, por lo que fueron seleccionados para determinar los valores mínimos de concentración inhibitoria y mínima bactericida contra *E. coli* ATCC 25922. Los valores de concentración mínimade inhibición oscilaron entre 0,33 y 0,55 mg/mL y los valores de concentración mínimade bactericida oscilaron entre 0,42 y 0,95 mg/mL.

Fancello *et al.* (2020) determinaron la actividad antimicrobiana de *Citrus limón* var *Pompia* para esto se recolectaron 3 muestras de hojas de *pompia* y se sometió a destilación al vapor durante 2 horas utilizando un aparato tipo Clevenger, se utilizó sulfato de sodio para deshidratar y se almaceno. El rendimiento de aceites esenciales oscilo entre 0,43% (v/p) y 0,52% (v/p) calculado a partir del peso seco. Este estudio mostro una posible actividad antibacteriana selectiva, aceite esencial de pomelo y limón contra bacterias patógenas.

Al-Jabri y Hossain (2018) Identificaron la composición de aceites esenciales

por cromatografía de gases espectrometría de masas (GC-MS) a partir de frutos de limón dulce omaní y dulce de oman, por el método de hidrodestilación con el aparato tipo Clevenger, determino su actividad antimicrobiana con microorganismos grampositivos (+) *Staphylococcus aureus* y tres bacterias gram (-), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris*, por el método de difusión en disco. Ambos aceites esenciales contienen 22 compuestos activos con una variación de porcentaje identificados por el tiempo de retención en la cromatografía de gases. El principal compuesto bioactivo con alto contenido en aceite esencial de limón dulce de Omán fue limoneno (84,73%), α -pineno (1,06 %), α -terpineol (2,80 %), β -mirceno (2,16 %), β -pineno (3,36%), terpineno-4-ol (1,16 %) y α -terpinoleno (2,33%). Así mismo el aceite esencial dulce de omaní estaba compuesto por limoneno (53,57%), α -terpineol (14,69%), β -pineno (8,23%), α -pineno (1,84%), β -mirceno (1,51%), α -terpinoleno (4,33%), terpineno-4-ol (3,38 %), cimeno (1,80%), β -bisaboleno (1,43%), β -linalool (0,85%) y E-citral (1,08%). Los resultados indican que ambos aceites esenciales dieron muy buenos resultados químicos y la actividad antimicrobiana mostro que los aceites esenciales en la mayoría de las concentraciones no dieron actividad contra las cepas bacterianas patógenas seleccionadas.

Aguirre y Natali (2017) Indicaron el efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela y de limón en la cobertura comestible, el tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras y aceptabilidad general en rodajas de banano (*Musa paradisiaca*), llegando a determinar que el tratamiento de cobertura con aceite esencial de canela presentó el menor recuento de mohos y levaduras (200 *ufc/g*), seguido del tratamiento con cobertura de aceite esencial de limón (750 *ufc/g*), ambos, fueron mejores en comparación del

tratamiento control (1233 ufc/g).

Torrenegra *et al.* (2017) estudiaron la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género Citrus, evaluaron la actividad antibacteriana de las diferentes especies de aceites esenciales del género citrus frente a patógenos como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, lograron determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Los aceites esenciales fueron obtenidos mediante hidrodestilación (HD) e hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWH), para la actividad antibacteriana se prepararon los inóculos en sus agares específicos, se incubaron y alcanzaron una densidad óptica de 620 nm (DO620), utilizaron como control positivo a la gentamicina sulfato. Para la (CMI) se determinó que presentaron un porcentaje superior al 90% frente a las diferentes cepas bacterianas, se concluyó que las diferentes especies del género citrus son considerados de gran interés para la actividad.

Argote *et al.* (2017) Evaluaron la actividad antimicrobiana de tres tipos de aceites esenciales Eucalipto (*Eucalyptus*), cáscara de limón (*Citrus limón*) y mandarina (*Citrus Reticulata*) mediante el método hidrodestilacion, utilizaron 400 g de muestra y obtuvieron 10 mL de aceite esencial. La actividad antibacteriana se determinó con la concentración mínima inhibitoria y bactericida, mediante el método de micro dilución, con una emulsión en caldo colorimétrico. El aceite esencial de eucalipto y mandarina indican la menor concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida frente a *Staphylo-coccus aureus* (6,8 µL/mL), respecto a la bacteria patógena *Escherichia coli* esta muestra susceptibilidad a los tres aceites, siendo menor para eucalipto y mandarina con valores de concentración mínima

inhibitoria y mínima bactericida de 13,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Los resultados demostraron que los aceites esenciales de eucalipto, cascara de limón y mandarina tienen capacidad inhibitoria para las bacterias *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Al-Jabri y Hossain (2014) Identificaron dos aceites esenciales de dos muestras de frutas de limón turco e indio recolectadas en un supermercado, el aceite se obtuvo por el método de hidrodestilación con el aparato tipo clevenger, su composición química se identificó por cromatografía de gases y espectrómetro de masas encontrando 22 componentes bioactivos predominando el limón turco con el DL-limoneno (78,92%), a-pineno (5,08%), L-a-terpineol (4,61%), b-mirceno (1,75%), b-pineno (1,47%) y b-linalol (0,95%) y en el aceite esencial de la India fueron DL-limoneno (53,57%), L-a-terpineol (15,15%), b-pineno (7,44%), a-terpinoleno (4,33%), terpinen-4-ol (3,55%), cimeno (2,88%) y E-citral (2,38%). La actividad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en disco frente a bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *Proteus vulgaris* (*Pseudomonas vulgaris*). *aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *Proteus vulgaris* (*Pseudomonas vulgaris*). Se informa que el aceite turco dio inhibición frente a *P. aeruginosa* en concentraciones de 1, 0.5 y 0.25 mg/mL con el rango de 0 a 7 mm, *P. vulgaris* y *S. aureus* dio inhibición contra el aceite turco en concentración 0,5 mg/mL con un diámetro 5 y 6 mm. Pero *E. coli* no mostró ninguna actividad en ninguna concentración. El aceite de limón indio inhibió las bacterias patógenas *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* en la concentración de 2 mg/mL con zona de inhibición 6, 75 y 70 mm, *P. vulgaris* no dio ninguna actividad en la concentración 2 mg/mL. Pero, el aceite esencial indio en concentración 0,25 mg/mL contra *P. vulgaris* dio poca

actividad.

Da Silva (2015) Obtuvo el aceite esencial por destilación de arrastre de vapor, así también el macerado proveniente de cáscara, semilla y hoja de limón. De las tres variedades del limón (*Citrus limón* (L) Osbeck), (*Citrus limón* (L) Osbeck) combinado con (*Citrus reticulata*) y (*Citrus médica* (L). La variedad de (*Citrus limón* (L) Osbeck) cascara y hoja presento mayor cantidad de principio activo con mayor actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y no presento actividad la semilla, el macerado de las diferentes partes del (*Citrus limón* (L) Osbeck) solo la hoja presento actividad mas no la semilla. Osbeck) solo la hoja presento actividad mas no la semilla. El aceite esencial de hoja y cáscara del fruto de la variedad *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación (*Citrus reticulata*) presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* el aceite esencial proveniente de hoja y cáscara de la variedad (*Citrus medica*) (L) frente a *Staphylococcus aureus* presentó actividad. El macerado de las diferentes partes de (*Citrus reticulata*) y (*Citrus medica* (L)) no presentaron actividad antimicrobiana.

Torrenegra *et al.* (2017) obtuvieron aceites esenciales, mediante hidrodestilación e hidrodestilación asistida por la radiación con microondas, de las especies vegetales naranja (*Citrus sinensis*), limón (*Citrus aurantifolia*), mandarina (*Citrus reticulata*), pomelo (*Citrus paradisi*), *reticulata*), pomelo (*Citrus paradisi*), cultivadas en el norte del departamento de Bolívar (Colombia); y se determinó la composición química, donde el limoneno es el monoterpeno en mayor proporción (72,11% y 93,55%), el aceite esencial de *C. reticulata* mostró un mayor porcentaje, seguido de *C. sinensis* y *C. paradisi*. La sensibilidad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria *in vitro* de los aceites esenciales frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. mostraron un mayor efecto inhibitorio frente a cepas Gram-negativas.

Tam (2015) evaluó el efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limón* (limón) sobre *Staphylococcus aureus metilino* resistente y comparo con el efecto antimicrobiano de vancomicin obteniendo cuatro concentraciones 5 % (50 mg/mL), 25 % (250 mg/mL), 50 % (500 mg/mL), 75% (750 mg/mL) que se utilizó con el *S. aureus metilino* resistente por el método de difusión en disco y se comparó con el antibiótico vancomicina, se comparó los halos de inhibición siendo sensible en todas las concentraciones.

CAPÍTULO III

HIPOTESIS Y VARIABLES

3.1. Hipótesis

El aceite esencial de *Citrus limon* (L.) Osbeck obtenido presenta una composición química que le confiere propiedades antimicrobianas y puede ser efectivo contra cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, lo que lo convierte en un potencial conservante natural en la industria alimentaria.

3.2. Identificación de variables e indicadores

Variable independiente

Aceite esencial de las cáscaras de *Citrus limón* (L) Osbeck.

Variable dependiente

Actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 y *Escherichia coli* ATCC 8739.

3.3. Operacionalización de variables

Tabla 1: Operacionalización de Variables

Variable	Dimensión	Indicadores	Niveles	Criterios de medición	Escala de medición de variable
Aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (L.) Osbeck	Tiempo	Magnitud Física Fundamental (horas)	24-48 horas	Cuantitativa	discreta
	Concentración	Relación entre la cantidad o volumen de soluto y la cantidad de disolución (mg/mL)	<ul style="list-style-type: none"> • CMI Y CMB - 855mg/mL - 285 - 122.15 - 57 - 27,59 - 13,58 - 6,74 - 3.36 • Sensibilidad - 100%-855mg/mL - 75%-641,25 - 50%-427.5 - 25%-213.75 	Cuantitativo	Ordinal

Actividad antimicrobiana sobre cepas ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i>	Diámetro del halo	Medida de inhibición de halo (mm)	Tamaño del halo	Cuantitativo	Discreta
---	-------------------	-----------------------------------	-----------------	--------------	----------

CAPITULO IV

METODOLOGÍA

4.1. Ámbito de estudio, localización política y geográfica

Para llevar a cabo el desarrollo del proyecto de investigación se eligió como lugar para obtener la materia prima del *Citrus limón (L)Osbeck* la Región Cusco - Provincia la Convención-Distrito de Echarate-Illapani-Palma Real 780 metros, en el fundo libertad, latitud -12,6256 y una longitud de -72,6939.

El ámbito del distrito de Palma Real, se ubica en el actual distrito de Echarati, provincia de La Convención, departamento de Cusco, área de influencia del Valle Rio Apurímac, Ene y Mantaro – VRAEM. Este limón se empezó a sembrar en el año 2017, el *Citrus limón (L) Osbeck* tiene una edad de 4 años aproximadamente existen 5000 árboles sembrados, el proceso de recolección es manual, los arbolitos están en línea, se tiene una producción aproximada de media tonelada por semana, el clima es uno de los factores determinantes para el crecimiento de la planta es así que el fruto de limón desarrolla con gran facilidad entre los 800 a 1200 m, aunque también se obtienen buenas cosechas en los lugares de altura considerable comprendidas entre los 1800-3000 m y en ambientes de los 22-26 °C se obtienen limones de calidad.

Figura 9: Mapa de ubicación del distrito de Palma Real



Fuente: Congreso de la República (2018)

4.2. Tipo y nivel de investigación

Es de tipo experimental, explicativo

Experimental: Porque se manipuló la variable independiente (aceite esencial de las cáscaras del *Citrus limón* (L) Osbeck) para observar su efecto sobre la variable dependiente (actividad antibacteriana frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Escherichia coli* ATCC 8739).

Explicativo: Se interpretó y relaciono las diferentes concentraciones del aceite esencial de las cáscaras de *Citrus limón* (L) Osbeck y la actividad antibacteriana frente a a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC 9027 y *Escherichia coli* ATCC 8739).

4.3. Unidad de análisis

Aceite esencial de las cáscaras del *Citrus limón* (L) Osbeck

4.4. Población de estudio

En este estudio se seleccionó población como la cascara de los limones procedentes de la Región Cusco -Provincia La Convención-Distrito de Echarate-Illapani- Palma Real a 780 m de altitud, en el fundo Libertad y la población microbiológica fueron las bacterias de las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Escherichia coli* ATCC 8739). El muestreo se realizó de manera aleatoria.

4.5. Tamaño de muestra

Para la extracción del aceite esencial del *Citrus limón* (L) Osbeck se utilizó 350,62 g de los cuales se obtuvo, 10.3 mL de aceite esencial.

4.6. Técnicas de selección de la muestra

Técnica de muestreo simple

4.7. Técnica Recolección de información

Fuentes de información Primaria. Se ejecutó en el equipo de hidrodestilación – trampa de Clevenger, la materia prima fue acondicionada y los datos se obtuvieron de forma experimental.

Fuentes de información Secundaria. La información recolectada para la obtención del aceite esencial del *Citrus limón* (L.) Osbeck y su efecto antimicrobiano se obtuvo a través de artículos científicos vía web, biblioteca especializada de la Escuela Profesional de Química.

4.8. Equipos y Reactivos

- a) Equipo Thermo scientific Waltham, trace 1310 GC-MS, ISQ con una columna capilar de 30 m x 0,25 mm de diámetro interno TG-5SilMS Temperatura máxima de 320-350 °C
- b) Equipo de hidrodestilacion-trampa de Clevenger
- c) Reactivos: Hidróxido de potasio 0.5 N, alcohol 96 %, fenolftaleína 1 %, ácido clorhídrico 0.5 N
- d) Cepas de microorganismos utilizados en la investigación.
 - ✓ *Escherichia coli* ATCC 8739 KWIK STIK Microbiology
 - ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 KWIK STIK Microbiology
 - ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 KWIK STIK Microbiology
- e) Agar Mac Conkey, Agar Manitol Salado, Agar Cetrimide
- f) Gentamicina, ampicilina, trimetropin, ciprofloxacino
- g) Agar Muller Hinton

– **Obtención del aceite esencial de *Citrus limón* (L) Osbeck**

La especie vegetal *Citrus limón* (L) Osbeck fue recolectada en el fundo Libertad (procedente de la región Cusco-Provincia de La Convención, Distrito de Echarate-Illapani-Palma Real a 780 m de altitud. Esta recolección se realizó en horas de la mañana (10:00 am.) siguiendo las técnicas indicadas y bajo la supervisión del personal encargado de la cosecha, para lograr recolectar la cantidad suficiente y en las mejores condiciones para dicho estudio la identificación taxonómica se realizó en el Herbario Vargas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (Anexo 02).

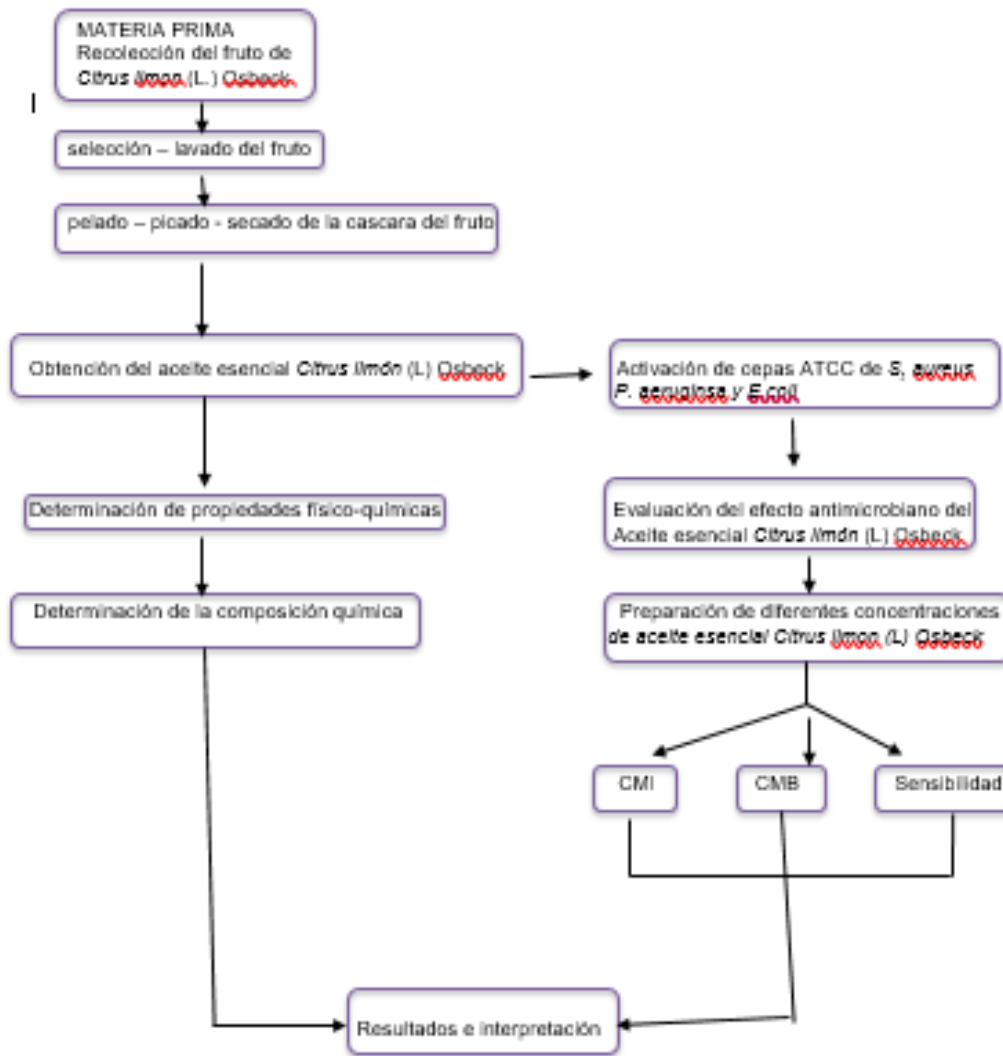
Se recolectó 5 kilos del fruto del *Citrus limón* (L) Osbeck, seleccionando los mejores en color y tamaño, se lavó, se seleccionó las que se encontraban frescas, enteras, sin señales de deterioro, seguidamente se peló y cortó las cáscaras en trozos de tamaño aproximado de 3 cm. dejando secar al medio ambiente aproximadamente 3 días, se pesó y se procedió al proceso de extracción del aceite esencial

La extracción del aceite esencial se obtuvo mediante el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger, es un sistema cerrado en donde el aceite esencial extraído es retornado al balón de destilación en un proceso que se repite hasta la total extracción, Posteriormente se procedió a deshidratar el aceite usando sulfato de sodio anhidro.

El aceite esencial obtenido fue almacenado en frascos de color ámbar a una temperatura de 4 °C al abrigo de la luz, hasta su análisis y caracterización. Este procedimiento es de bajo costo y no contamina el medio ambiente, el tiempo de destilación depende de los componentes presentes. Se tendrá la

presencia de dos fases inmiscibles a lo largo de la destilación (orgánica y acuosa), es el método más antiguo y sencillo para obtener aceites esenciales, a partir del material vegetal. Es un procedimiento utilizado para separar sustancias insolubles en agua y de elevado punto de ebullición, se obtuvo 10 mL de aceite esencial (Villamizar y Aular, 2022).

Figura 10
Flujograma de la obtención de aceite esencial *Citrus limon* (L.)



A. Determinación del porcentaje de rendimiento del extracto de aceite esencial de *Citrus limón* (L) Osbeck

El porcentaje de rendimiento de los aceites esenciales, se determinó con

los volúmenes de los aceites esenciales extraídos por el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger. El porcentaje de rendimiento se determinó por el método gravimétrico volumétrico, aplicando la siguiente fórmula (Blas & Fernández, 2021):

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Vol. (mL)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100 \quad (1)$$

- volumen del aceite esencial obtenido en mL
- Peso de la muestra a destilar en gramos

B. Análisis Físico-Químico del Aceite Esencial de *Citrus limón* (L.)

Se determinaron, solubilidad en diferentes solventes entre apolar y polar, la densidad, índice de refracción, índice de carbonilo, índice de saponificación, índice de acidez.

- **Solubilidad:** Se trata de una medida de la capacidad de una cierta sustancia para disolverse en otra. La sustancia que se disuelve se conoce como soluto, mientras que aquella en la cual este se disuelve recibe el nombre de solvente o disolvente. La concentración hace referencia a la proporción existente entre la cantidad de soluto y la cantidad de disolvente en una solución.

Densidad: La densidad es una magnitud física que relaciona la cantidad de materia existente en un espacio es decir relaciona la masa de un objeto con el volumen que ocupa. En el sistema internacional de medidas, la unidad utilizada para cuantificar la densidad es Kg/m³, Para el caso de los aceites esenciales es recomendable expresar la densidad en términos de g/mL.

Se utilizó el método del picnómetro, a temperatura 20 °C (ISO 279, 1981). La relación entre el peso del picnómetro lleno de aceite esencial y de agua nos permite calcular la densidad del aceite esencial.

$$Densidad = \frac{masa}{volumen} \quad (2)$$

- **Índice de Refracción:** El índice de refracción de un líquido es una magnitud física que determina la proporción del cambio de dirección de un rayo de luz al cambiar el medio en el que se mueve, específicamente cuando entra en contacto con un líquido. Para el caso de los aceites esenciales, el índice de refracción es un parámetro propio de cada aceite esencial, y por lo tanto, si un aceite es mezclado con diluyentes u otras sustancias, su índice de refracción cambia, por lo cual este es un parámetro que sirve para determinar la pureza de un aceite esencial. El procedimiento de cálculo puede realizarse mediante la utilización de un refractómetro electrónico que permite medir la velocidad de propagación de la luz en un medio.
- **Polarimetría:** Con esta técnica se determina la propiedad de algunas sustancias de hacer girar el plano de la luz polarizada y se dice que son ópticamente activas y las sustancias que tienen esta propiedad son asimétricas ósea no tienen un plano de simetría. Si el plano de luz gira en sentido contrario al de las manecillas del reloj se dice que es levo (-) y si la rotación tiene el sentido de las manecillas del reloj se dice que es dextro (+). La magnitud de la rotación varía de un compuesto a otro y cuando se mide adecuadamente sirve como método analítico.

La ecuación básica es la siguiente:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha_{\lambda}^T}{c \cdot l} \quad (3)$$

α : Rotación óptica observada

$[\alpha]$: Rotación óptica específica

L : Longitud de la cubeta en (dm)

C : Concentración de la muestra (g/mL)

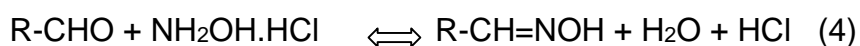
λ : Longitud de onda de la luz (línea D del sodio, 589 nm)

t : temperatura (25°C)

- **Índice de Carbonilo expresado como porcentaje de citral:** La determinación del índice de carbonilo permite conocer el contenido en aldehídos, expresado como citral, se le atribuye ser el principal responsable del aroma, como consecuencia, su contenido es un indicador del valor comercial del aceite esencial.

El fundamento de esta técnica se basa en que la adición del clorhidrato de hidroxilamina que produce la oximación por parte de la hidroxilamina del doble enlace carbonílico del grupo aldehído formando una aldoxima y liberando el HCl.

La reacción es la siguiente:



Se preparó soluciones alcohólicas a partir del alcohol del 96% v/v para concentraciones de 60 % y 95 % empleando para la medición un alcoholímetro, se preparó KOH 0.5N la dilución se realiza con alcohol del 60% en una fiola de 250 mL, para la preparación de la solución del clorhidrato de hidroxilamina se pesó 3,6 g de

cloruro de hidroxilamina el cual fue agregado a una fiola de 100 mL y se adiciono agua destilada 39,25 mL alcohol del 95 % hasta el aforo quedando preparada para la valoración. Para la preparación de la muestra se utilizó 100 micro litros de aceite esencial *Citrus limón* (L) Osbeck y se trasvaso a un matraz de 250 mL, se agregó 10 mL de la solución de clorhidrato de hidroxil amina y unas gotas del indicador azul de bromo fenol y anaranjado de metilo y se valoró con KOH 0,5N hasta un cambio de color verde.

$$\text{Citrál (p/v)} = 0,076x V \text{ KOH} x 100 \quad (5)$$

- **Índice de Saponificación:** La saponificación son los mg de KOH que se necesitan para saponificar un gramo de grasa. Se partió de 100 microlitros del aceite esencial en un balón de 250 mL, se le añadió 50 mL de la disolución etanolica de KOH 0.5 M, se adiciono un agitador magnético y se acoplo a un refrigerante poniendo a reflujo en baño de agua por 30 minutos con agitación continua, pasado el tiempo de reacción se enfría el balón y se añade 6 mL de agua y 2 gotas de fenolftaleína al 1% al contenido del balón y valoramos con HCl 0,5 M, llenamos la bureta con HCl y el final se da cuando el viraje de rosa intenso pasa a incoloro.
- **Índice de Acidez:** Es un indicador de calidad, es una medida del grado de hidrolisis, los aceites esenciales están formados por triglicéridos y estos son susceptibles a sufrir una reacción de hidrolisis liberando ácidos grasos que incrementan la acidez, el índice de acidez nos informa el contenido de ácidos grasos presentes en el aceite esencial generalmente se expresa como porcentaje de ácidos oleico por cada 100 g de grasa y se define como los mg de KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres que están en un gramo de muestra. La determinación consistió en preparar una muestra de

disolvente en proporción 1:1 de alcohol etílico y éter al cual se le añadió una gota de fenolftaleína y se neutralizó con solución etanólica KOH 0.1 N, seguidamente se utilizó 100 microlitros del aceite esencial *Citrus limón* (L) Osbeck y se disolvió con la preparación anterior adicionando 0.1 mL de fenolftaleína al 1% y valorando con solución etanólica de KOH hasta la aparición del color fucsia característico del medio alcalino, se anota el volumen gastado y se calcula.

$$\text{Índice de Acidez} \left(\text{mg} \frac{\text{KOH}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{N KOH} \times \text{VKOH} \times \text{P eq KOH}}{\text{g muestra}} \quad (6)$$

C. Determinación de la Composición Química

El aceite de esencial *Citrus limón* (L) (Osbeck) obtenido, fue analizado, por cromatografía de gases –espectrometría de masas, se identificó 28 componentes químicos diferentes con diferentes porcentajes lo que representa alrededor del 96% de la composición total.

Se empleó un equipo Thermo scientific Waltham, trace 1310 GC-MS, ISQ con una columna capilar de 30 m x 0,25 mm de diámetro interno TG-5SilMS Temperatura máxima de 320-350 °C, los análisis se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial 70 °C después de 2 minutos sube a 250 °C, con incremento de temperatura de 4 °C por minuto, se mantuvo por 10 minutos a 250 °C. Se utilizó Helio como gas portador con un flujo de 1 mL por minuto. La temperatura del inyector y detector fue de 250 °C y el volumen de inyección fue de 1 µL y una dilución Split de 1/100.

Los componentes químicos en los aceites esenciales fueron identificados sobre la base del tiempo de retención en un capilar de sílice fundida.

D. Análisis Microbiológico

a) Activación de cepas ATCC.

La activación de los microorganismos se realizó tomando en cuenta las recomendaciones del fabricante:

- Se saturó el hisopo con la cepa ATCC en el material hidratado y se transfirió en medios de cultivo selectivos para cada microorganismo, para *Escherichia coli* ATCC 8739 en agar Mac Conkey, para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en Agar Manitol Salado y para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en Agar Cetrimide.
- Se incubó a 35-37 °C por 24-48 horas.

b) Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) o Efecto Bacteriostático. Según Gil (2016) Modificada en la presente investigación.

- Luego de activadas las cepas ATCC se pre hidrataron en caldo BHI y se incubaron por 24 horas a 37 °C, hasta alcanzar la turbidez de patrón de 0.5 % de la escala de Mac Farland equivalente a 1.5×10^8 ufc/mL.
- Para las diluciones se utilizó la técnica de macro dilución en tubos con algunas adaptaciones por tratarse de un producto natural diferente a los antibióticos comunes, Gil et al. 2016 y se procedió de la siguiente manera:
 - ✓ Por cada bacteria ATCC, usada se preparó una batería de 10 tubos de 2 mL de capacidad con 200 µL de caldo BHI para realizar 10 diluciones puntuales, un control negativo y un control positivo.
 - ✓ Las diluciones del aceite esencial de *Citrus limón* (L) se prepararon en proporciones de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256.

- ✓ Luego se añadieron en cada tubo 10 µL de la suspensión de la cepa ATCC a 0.5 % de la Escala de Mac Farland y se incubó a 37 °C x 24-48 horas.
- ✓ Se realizó observación de turbidez en cada tubo comparado con los controles.
- ✓ Posteriormente se inoculó de cada tubo 10 µL a placas con medio selectivo de:
 - Agar Mac Conkey para *Escherichia coli* ATCC 8739.
 - Agar Manitol Saldado para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
 - Agar Cetrimide para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
- ✓ Se incubó a 37 °C de 24-48 horas.
- ✓ Luego se realizó conteo de colonias para determinar el efecto Bacteriostático (CMI), utilizando el siguiente criterio:

Placas:

- +++ > 100,000 ufc/mL
- ++ 50,000 – 100,000 ufc/mL
- + <50,000 ufc/mL
- 0 ufc/mL

c) Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) o Efecto Bactericida Gil (2016) Modificada en la presente investigación.

1. Por cada bacteria ATCC, usada se preparó una batería de 10 tubos de 2 mL de capacidad con 200 µL de caldo BHI para realizar 10 diluciones puntuales, un control negativo y un control positivo.
2. Las diluciones del aceite esencial de *Citrus limón* (L) se prepararon en proporciones de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256.

3. Luego se añadieron en cada tubo 10 μ L de la suspensión de la cepa ATCC a 0.5 % de la Escala de Mac Farland y se incubó a 37 °C x 24-48 horas.
4. Se realizó observación de turbidez en cada tubo comparado con los controles.
5. Posteriormente se reinoculó de cada tubo 10 μ L a 2 mL de caldo BHI previamente preparados en tubos de 10 mL de capacidad.
6. Se incubó a 37 °C de 24-48 horas.
7. Luego se realizó la lectura de turbidez para determinar el efecto bactericida (CMB), utilizando el siguiente criterio:
 - + Turbidez aparente
 - No turbidez

d) Sensibilidad Antimicrobiana, según método de pozo excavado. modificado en la presente investigación (Pumaylle, 2012)

Preparación de concentraciones de Aceite esencial de *Citrus limon* (L.):

- Se preparó Aceite esencial en concentraciones de 25 %, 50%, 75 %, 100 %, diluidas en etanol absoluto.

Sensibilidad antimicrobiana:

- Luego de activar las cepas ATCC en agar selectivo para cada una.
- Se preparó una suspensión con 3-5 colonias en 5 mL de caldo BHI incubada a 37 °C por 2-5 horas comparada a 0.5 % de la Escala de Mac Farland.
 - En agar Muller Hinton previamente preparadas se realizó tres perforaciones de 5.5 mm de diámetro con capacidad de 100 μ L a una

distancia de 22 mm cada pozo.

- Se procedió a la siembra de cada cepa ATCC en forma homogénea por diseminación en superficie con ayuda de un hisopo estéril.
- Se aplicaron las concentraciones del aceite esencial de *Citrus limon* (L) Osbeck por triplicado en placas con agar Muller Hinton.
- Se incubaron a 37 °C por 24-72 horas.
- Paralelamente se utilizó patrones de sensibilidad de antibióticos para cada cepa:
 - ✓ *Escherichia coli* ATCC 8739 Gentamicina y Ampicilina.
 - ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 Oxacilina y Trimetropin.
 - ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 Ciprofloxacina y Ampicilina.
- Las lecturas de los halos de inhibición se realizaron desde las 24 horas y se confirmó a las 48-72 horas.
- La medición de halos de inhibición se realizó mediante uso de un vernier.

4.9. Técnicas para demostrar la verdad o falsedad de las hipótesis planteadas

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS Statics, en el que se realizó Análisis de varianza (ANOVA), para determinar la significancia estadística de las diferentes concentraciones utilizadas en los extractos. Prueba de Scheffe, para determinar qué concentraciones de los extractos utilizados tienen diferencias significativas.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Análisis Físico - Químico del aceite esencial de *Citrus limón* (L) Osbeck

El aceite esencial *Citrus Limón* (L) Osbeck obtenido por el método de hidrodestilación-trampa de Clevenger a la temperatura de 89 °C en el laboratorio de fitoquímica de la Facultad de Química –UNSAAC fue envasado en un vial de vidrio acaramelado de uso cromatográfico, obteniéndose un rendimiento (0,315% v/p), resultado del promedio de tres pesadas 350.87 mg, 350.66 mg y 350,35 mg con el promedio de tres volúmenes 0,85 mL, 1,30 mL, y 1,16 mL.

Tabla 2: *Concentración del aceite esencial Citrus Limón (L) Osbeck*

Determinación	Resultados
Peso de muestra g	350,62
Volumen de aceite esencial	1,103 MI
% de Rendimiento (v/p)	0,315

Siancas (2021) reporta un porcentaje de rendimiento de 0,647% y Urrunaga et al. (2022) reporta 0,72% de rendimiento Hosni (2022) 1,06%, el porcentaje de aceite obtenido en esta investigación inferior a los reportados en otras investigaciones, esto debido a las condiciones geográficas.

5.2. Solubilidad

Se utilizó los siguientes disolventes:

- 20 microlitros de aceite esencial del *Citrus Limón* (L) Osbeck
- 0,5 mL de disolvente

Tabla 3: Solubilidad del aceite esencial *Citrus Limón (L) Osbeck*

Disolvente	Solubilidad
Metanol	Soluble
Etanol absolute	Soluble
Acetona	Soluble
Dicloro metano	Soluble
Hexano	Soluble parcialmente forma ligera emulsión
Acetato de etilo	Soluble
Agua	Immiscible

Tabla 4: Comparación de la solubilidad del aceite esencial con el CODEX

Solubilidad	CODEX	Aceite esencial de limon Obeck
Alcohol absoluto (P)	Soluble	Soluble

El aceite esencial *Citrus limón (L) Osbeck* es soluble en solventes apolares e inmisible en el agua como se muestra en la tabla 3.

5.3. Densidad

Se determinó según (*ISO 279, 1981*). (método de prueba estándar para densidad y densidad relativa) y se comparó con las normas internacionales de los alimentos CODEX (2004). Los resultados son muy cercanos a la referencia.

Tabla 5: Densidad del aceite esencial *Citrus Limón (L) Osbeck*

	Muestra
Densidad absoluta (20°C, g/mL)	0,8707 g/MI
Densidad absoluta (25°C, g/mL)	0,8689 g/MI
CODEX 20°C	0,842 - 0,856

Fuente: Obtenido de CIPAC handbook 2011.

Argote-Vega et al. (2017) reporta una densidad de 0,858 mg/mL, en ambos reportes se ven valores muy cercanos a los obtenidos en este trabajo experimental.

Tabla 6: Peso específico o densidad relativa del aceite esencial

	Muestra
Densidad absoluta (20°C)	0,8707
Densidad absoluta (25°C)	0,8689
CODEX 20°C	0,842 - 0,856

5.4. Índice de Refracción

De acuerdo a los resultados podemos observar que el aceite esencial *Citrus(L) Osbeck* tiene una pureza bastante alta.

Tabla 7: Índice de refracción del aceite esencial *Citrus Limón (L) Osbeck*

	Muestra
Índice de refracción – n_D^{20}	1,4783
CODEX 20°C	1,470 - 1,475

Argote-Vega et al. (2017) reporta un índice de refracción de 1,471, Siancas (2021) reporta índice de refracción para aceite de limón (raspado) 1,476 valores muy próximos a la del *Citrus limón (L) Osbeck*.

5.5. Polarimetría

Tabla 8: Polarimetría – rotación óptica del aceite esencial *Citrus limón* (L) Osbeck

	Muestra
Polarimetría 23°C	59,3 grados/dm.g/mL
CODEX	+55° y +75°.

La rotación óptica del aceite esencial *Citrus limón* (L) Osbeck es de naturaleza dextrógira es decir es ópticamente activo, rota en el sentido de las agujas del reloj Siancas (2021) reporta la rotación óptica (20 °C) 60,20°.es de naturaleza dextrógira

5.6. Índice de Carbonilo (Método de la hidroxilamina libre)

CARBONILO (%-citrál)2,43

El valor reportado indica que el aceite esencial *Citrus limón* (L) Osbeck contiene aldehídos y es susceptible a polimerizarse es decir degradación química en presencia de luz, calor, aire.

Siancas (2021) reporta % de citral 2,612

5.7. Índice de Saponificación

SAPONIFICACIÓN (miligramos de KOH/1-gramo de muestra)< **0,01**

El valor del índice de saponificación indica que el aceite esencial *Citrus limón* (L) Osbeck esta libre del grupo funcional carboxilo por tanto no es saponificable.

5.8. Índice de Acidez

ACIDEZ (miligramos de KOH/1-gramo de muestra)**7,55** ± 0,35

El valor del índice de acidez reporta la cantidad de acidos grasos presentes en al aceite esencial *Citrus limón* (L) Osbeck.

Argote *et al.* (2017) reporta un índice de acidez de 7,77 y Siancas (2021) reporta 8,06.

5.9. Perfil cromatógrafo de la composición química del aceite esencial *Citrus limón (L) Osbeck* por cromatografía de gases-espectrometría de masas se muestra en la figura (11)

Como se observa en la figura 11 la mayor parte de los compuestos presentes son probables precursores del aceite esencial *Citrus limón (L) Osbeck* estos son identificados mediante la base de datos del equipo de cómputo utilizado para el manejo del CG/EM.

En la figura 11 se muestran los principales componentes presentes en el aceite esencial extraído de las cáscaras de *Citrus limon (L) Osbeck*, destacando el limoneno con 30,16% como el principal componente, seguido del γ -terpineno con 12,41%, β -pineno con 12,3%, p-cumeno con 10,6%, y α -pineno con 4.79%.

Figura 11: Cromatograma de los picos correspondientes a cada uno de los componentes identificados por CG -EM

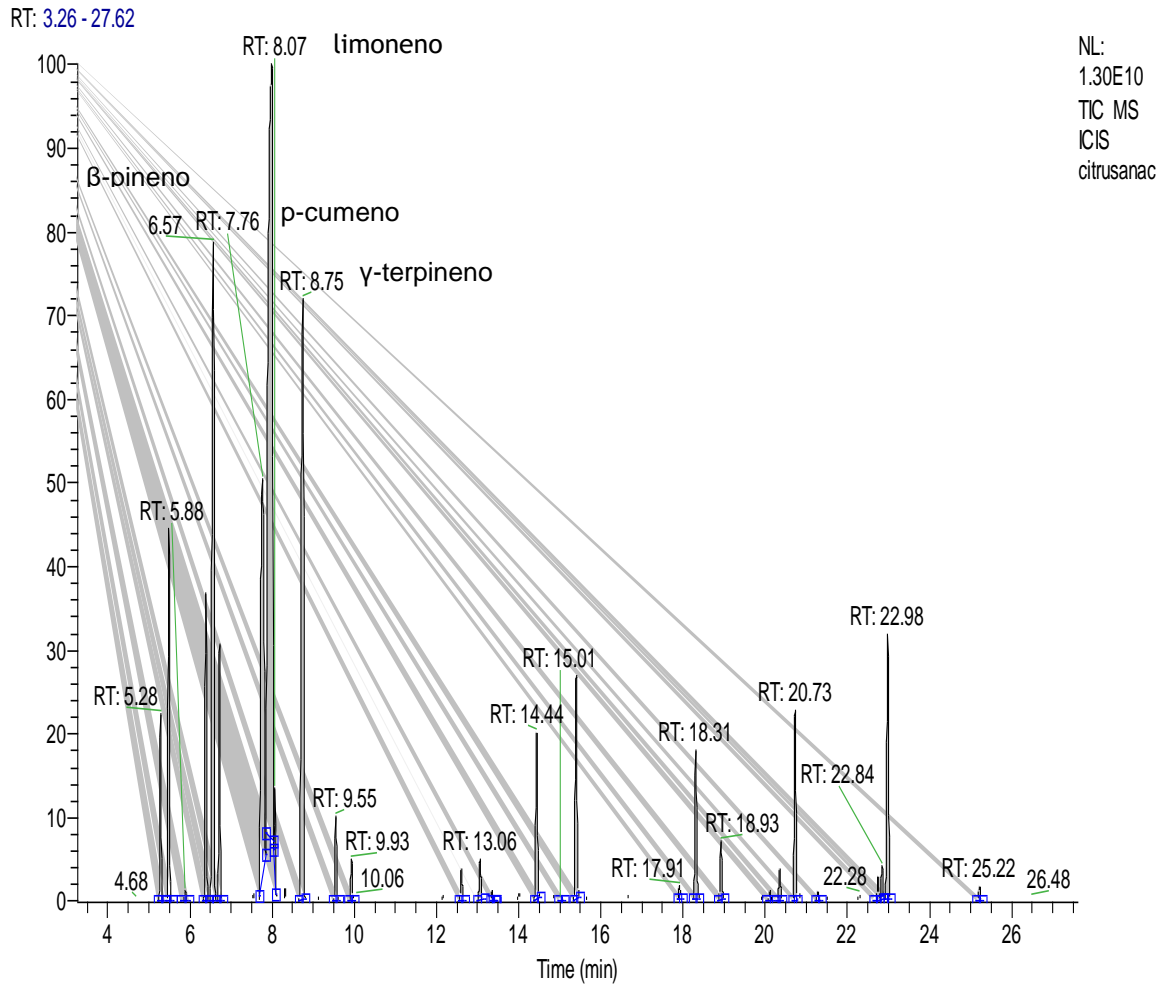


Tabla 9 Composición química del aceite esencial del aceite esencial *Citrus limón* (L). Osbeck

Pico	Componente	Estructura Química	End RT	%Area
1	alfa-felandreno		5.39	1.83
2	α -pineno		5.58	4.79
3	Canfeno		5.98	0.11
4	Sobinene		6.47	4.06
5	β -pineno		6.63	12.3
6	Mirceno		6.81	2.92
7	p-cumeno		7.84	10.6
8	Limoneno		8.04	30.16
9	Eucalytol		8.1	0.61
10	γ -terpineno		8.8	12.41
11	Terpinoleno		9.64	1.06
12	Linalool		10.01	0.52
13	p-metil-1-en-4-ol		12.69	0.44
14	p-metil-1-en-8-ol		13.16	0.6
15	N.I.		13.45	0.12
16	2-citral		14.52	2.4
17	E-citral		15.49	3.3
18	p-metil-8-en-1,2-diol		17.99	0.22
19	Acetato de Nerilo		18.4	2.15
20	Formato de linalool		19.01	0.84
21	2-norpinene-2,6-dimetil(4-metil-3-pentanol)		20.19	0.14
22	trans-Caryophyllene		20.42	0.46
23	Z)-Farnesene		20.79	2.8
24	trans-alpha-bisabolene		21.37	0.12
25	Farnesene		22.79	0.36
26	Bisabolenes		22.9	0.44
27			23.06	4
28	caryophyllene oxide		25.3	0.23

T.R. tiempo de retención

De los datos obtenidos de la tabla (9) tenemos Monoterpenos hidrocarbonados (76,07%), Monoterpenos oxigenados (4,79%), Sesquiterpenos (15,27%), siendo 96,13% la composición total del aceite esencial *Citrus Limón (L) Osbeck* de los cuales fueron identificados monoterpenos hidrocarbonados, siendo el más abundante el limoneno con un porcentaje de 30,16% seguido del γ -terpineno con 12,41%, β -pineno 12,3%, p-cumeno 10,65%, en los monoterpenos oxigenados el más abundante es el Eucalyptol 0,61%, el linalool (0,52%) y en los sesquiterpenos el α -pineno 4,79%, E-citral 3,3%.

Por otro lado Urrunaga et al. (2022) demostró que el principal componente del *Citrus jambhiri* (Limón rugoso) es el limoneno con un (37,7%), el β - pineno (25,1%) y el E- β -ocimeno (5,6%), los monoterpenos oxigenados constituyen un 15%, siendo los mayoritarios el citronelal (4,9%) y el linalool (4,1%) y los sesquiterpenos hidrocarbonados como el β -cariofileno en un 2,8%, de acuerdo a los resultados obtenidos en la composición del *Citrus Limon (L) Osbeck* el limoneno también es el componente mayoritario, sin embargo, se debe destacar el contenido de los monoterpenos oxigenados están en menor porcentaje y que los sesquiterpenos están en mayor porcentaje en comparación con la composición del *Citrus jambhiri* (Limón rugoso)

Así mismo, Singh et al. (2021) determinó la composición química y la bioactividad de la cascara de los cítricos y los principales componentes son los monoterpenos como limoneno identificado en la cáscara de diferentes especies de cítricos (92,52–97,3 %) y β -pineno (1,37–1,82), siendo el componente mayoritario al igual que el *Citrus Limón (L) Osbeck*.

En los aceites estudiados por Torrenegra et al. (2017), la fracción monoterpénica es la más abundante. El limoneno es el monoterpeno presente en mayor proporción (72,11% y 93,55%), abundancia relativa, El AE de *C. reticulata* mostró un mayor porcentaje, seguido de *C. sinensis* y *C. paradisi*; Entre los monoterpenos detectados en mayor proporción que le siguen al limoneno son el β -mirceno y el linalool, la fracción monoterpénica es la más abundante. Con respecto al estudio realizado en el presente trabajo el limoneno también es el componente de mayor porcentaje 30,16% seguido del γ -terpineno con 12,41%, β -pineno 12,3%, p-cimeno 10,65%, en los monoterpenos oxigenados el más abundante es el Eucalyptol 0,61%, el linalool (0,52%) y en los sesquiterpenos el α -pineno 4,79%, E-citral 3,3%.

De igual manera, la técnica de extracción por arrastre de vapor utilizando la trampa de Clevenger presenta ventajas destacables en cuanto a disminución de tiempo y uso de solvente (agua), calentamiento efectivo y tamaño de equipo reducido, es un método sencillo, reproducible y económico. Los aceites esenciales pueden ser una vía sustentable para la conservación de alimentos algunos beneficios para la salud del consumidor y gran ventaja y delantera frente a los conservantes sintéticos o químicos (Montalvo & Rojas, 2021).

El aceite esencial de *Citrus lemon*, extraído de la cáscara del limón, ha demostrado poseer propiedades antimicrobianas (Gutiérrez-Larraínzar et al., 2017). Además, conocer la composición química del aceite esencial de Citrus limón es fundamental para comprender su efecto antimicrobiano. En este sentido, el análisis de la composición química del aceite esencial de *Citrus limón* y su efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* se convierte en un tema de gran interés científico.

Cabe resaltar que los aceites esenciales mostraron un mayor efecto inhibitorio

frente a cepas Gram-negativas. Este comportamiento, probablemente se debe a que la pared celular de las bacterias Gram-positivas estudiadas está compuesta básicamente por péptidoglicano que representa hasta el 90% de la pared, ácidos teicoicos que también suelen estar presentes en pequeñas cantidades y polisacáridos; mientras que la pared celular de las Gram-negativas está constituida solo por el 10% del peptidoglicano, además posee tres polímeros que se encuentran fuera de su envoltura: lipoproteína, membrana externa y lipopolisacáridos, este último pudiera favorecer la entrada, por disolución de los aceites esenciales debido a su carácter hidrofóbico y provocar la muerte celular por desestabilización de la membrana externa y la membrana plasmática. Este lípido no está presente en las bacterias Gram-positivas y esta sería una causa probable del efecto del aceite en los diferentes grupos bacterianos, donde las bacterias Gram-negativas son relativamente más sensibles. El carácter hidrofóbico de los aceites esenciales le permite atravesar la pared celular de bacterias Gram-negativas a través de canales compuestos por unas proteínas llamadas porinas, las cuales se encuentran en la membrana externa y facilitan el transporte de nutrientes y sustancias de bajo peso molecular dentro de la célula, incluyendo agentes antimicrobianos (Vignola *et al.* 2020).

En el mecanismo de acción de los aceites esenciales como agentes antibacterianos, se debe considerar el gran número de compuestos químicos que se encuentran presentes en estos, cuyas actividades antibacterianas no presentan un mecanismo específico. El porcentaje de los principios activos en el aceite esencial de origen natural depende de la distribución geográfica, así como de las condiciones ambientales tales como temperatura, lluvia, altitud, horas de sol, etc (Al-Jabri y Hossain, 2018).

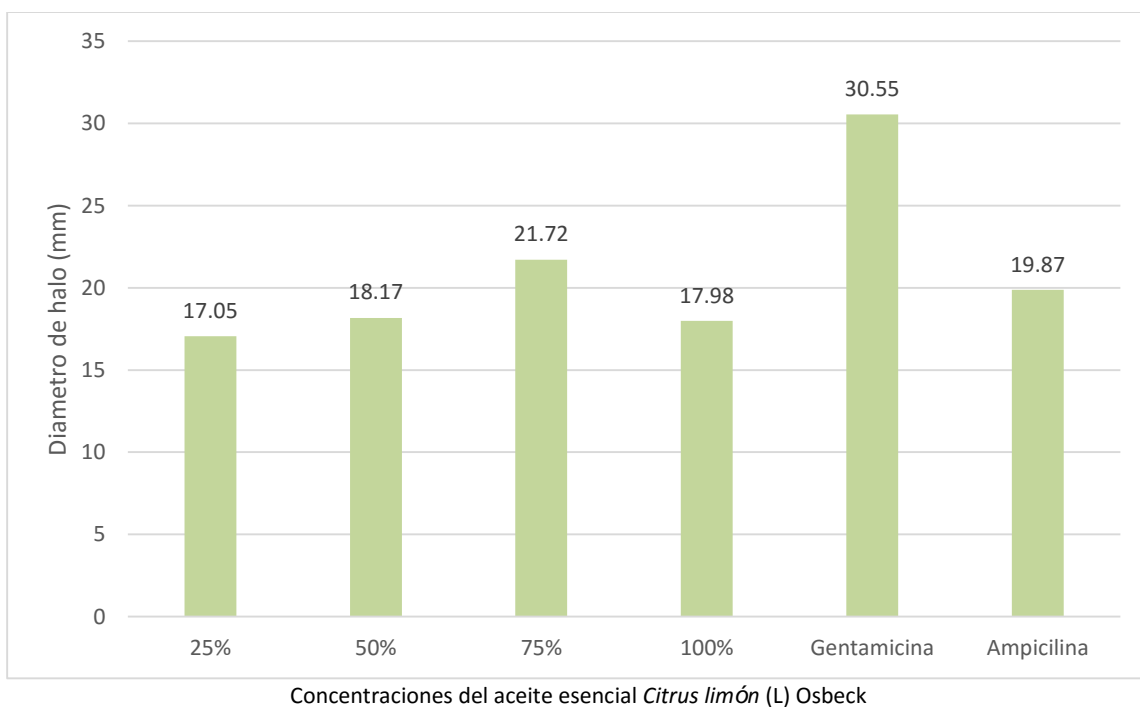
**5.10. Sensibilidad Antimicrobiana, del aceite esencial de *Citrus limón* (L.)
frente *Escherichia Coli* ATCC 8739**

Tabla 10 Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana in vitro de aceite esencial de *Citrus limón* (L) Osbeck a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli* ATCC 8739

Tratamiento	Repetición I	Repetición II	Repetición III
25%	15.96	17.94	17.24
50%	19.48	18.2	16.84
75%	21.50	22.11	21.54
100%	18.37	18.02	17.56
Gentamicina	30.50	30.55	30.6
Ampicilina	19.87	19.91	19.83

Nota: 100%= 855mg/mL

Figura 12: Comparación del tamaño promedio del halo según distintos tratamientos frente a *Escherichia coli* ATCC 8739



En la tabla 10 se muestra los valores que representa el tamaño de los halos de inhibición es decir la zona alrededor de un disco en el que no se reproduce crecimiento bacteriano, se trabajó con concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% de aceite esencial *Citrus limón (L)* Osbeck y controles de gentamicina y ampicilina, se realizó tres repeticiones, estos valores están representados en un diagrama de barras (figura12) en el que se observa que la concentración al 75% ha superado el tamaño del halo del control ampicilina mas no de gentamicina, por lo que esta concentración inhibe a *Escherichia coli*, la concentración del 100% reporta un diámetro de halo del 17,98 lo que indica que ha esta concentración el aceite esencial no tiene mucha potencia debido a que los patrones de resistencia cambian en forma constante y son impredecibles. Esta información es confirmada con las pruebas estadísticas de ANOVA Y TUKEY (tabla 12 y13).

En la tabla 12 se observa que con un sig de 0.125 superior a 0.05 se acepta que la distribución de los dímetros de halo generado por *escherichia coli* siguen distribución normal.

Tabla 11 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para tamaño de halo de *escherichia coli*.

	N	Parámetros normales		Estadístico de prueba	Sig.
		Media	Desv.		
Residuos de ANOVA	18	0.00056	1.02994	0.19284	,125

Tabla 12: Prueba ANOVA del tamaño promedio del halo acorde a los tratamientos frente a *Escherichia Coli*.

Origen	SC	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento	376.918	5	75.383	148.9486	0.000
Error	6.073	12	0.506		

Total, corregido 382.992 17

Nota: R al cuadrado = ,980

Tabla 13: Prueba Tukey tamaño de promedio halo y tratamiento frente a *Escherichia coli*

Tratamiento	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
25%	3	17.05			
100%	3	17.98	17.98		
50%	3		18.17		
Ampicilina	3		19.87	19.87	
75%	3			21.72	
Gentamicina	3				30.55

Con sig de 0.000 inferior a 0,05 en la prueba ANOVA se acepta que existe diferencia entre los tratamientos propuestos donde todas las concentraciones de aceite generan halos controles de 17.05, 18.17, 21.72 y 17.98 donde el halo más pequeño es de 25% y de 75% de aceite de *citrus limón (L)* Osbeck supera al antibiótico ampicilina teniendo capacidad de inhibición frente a *Escherichia coli*.

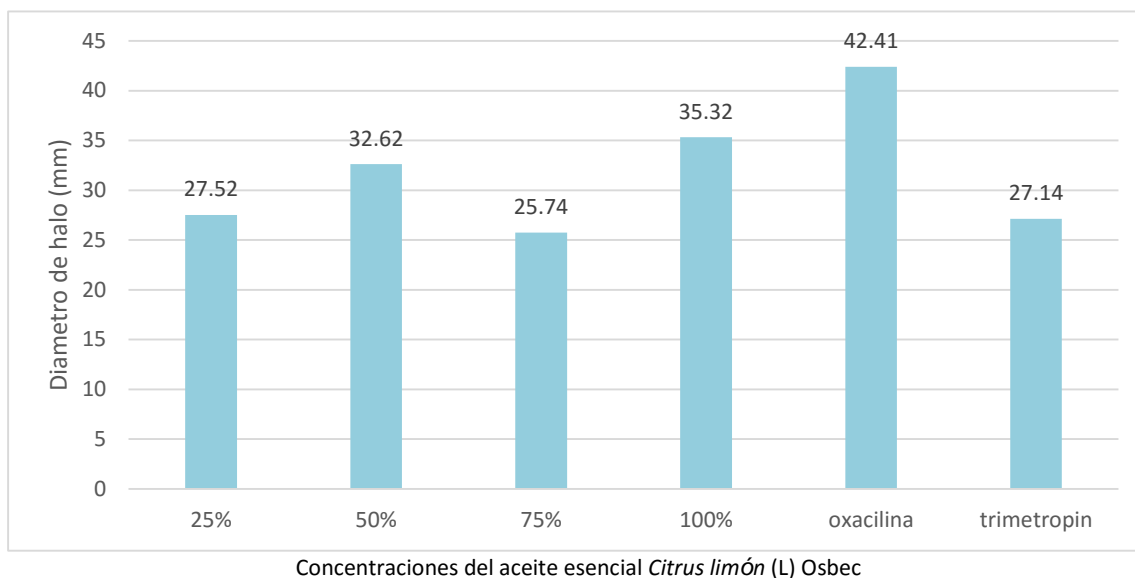
5.11. Sensibilidad Antimicrobiana, del aceite esencial de *Citrus limón (L)* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Tabla 14: Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana in vitro de aceite esencial de *Citrus limón (L)* Osbeck frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Tratamiento	Repetición I	Repetición II	Repetición III
25%	26.63	27.48	28.45
50%	31.55	31.55	34.76
75%	24.91	25.39	26.91
100%	30.27	36.28	39.4
Oxacilina	41.9	42.65	42.68
Trimetropin	27.14	27.12	27.16

Nota: 100%= 855mg/mL

Figura 13: Comparación de tamaño promedio del halo según distintos tratamientos frente a *Staphylococcus aureus*



En la tabla 14 se muestra los valores que representa el tamaño de los halos de inhibición es decir la zona alrededor de un disco en el que no se reproduce crecimiento bacteriano, se trabajó con concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% de aceite esencial *Citrus limón (L)* Osbeck y controles de oxacilina y trimetropin, se realizó tres repeticiones, estos valores están representados en un diagrama de barras (figura13) en el que se observa que la concentración al 50% y 100% han superado el tamaño del halo del control trimetropin mas no de oxacilina, por lo que estas concentraciones inhiben a *Staphylococcus aureus*, la concentración del 75% reporta un diámetro de halo del 25,74 lo que indica que ha esta concentración el aceite esencial no tiene mucha potencia debido a que los patrones de resistencia cambian en forma constante y son impredecibles. Esta información es confirmada con las pruebas estadísticas de ANOVA Y TUKEY (tabla 16 y17).

En la tabla 16 se observa que con un sig de 0.074 superior a 0.05 se acepta que la distribución de los diámetros de halo generado por *Staphylococcus aureus* siguen distribución normal.

Tabla 15: Prueba de Kolmogorov-Smirnov para tamaño de halo de. *Staphylococcus aureus*

	Parámetros normales				Sig.
	N	Media	Desv.	Estadístico de prueba	
residuos de ANOVA 2	18	0.00056	1.02900	0.21768	,074

Tabla 16: Prueba ANOVA del tamaño promedio del halo según los distintos tratamientos frente a *Staphylococcus aureus*.

Origen	SC	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento	607,227	5	121,445	26,903	,000
Error	54,170	12	4,514		
Total, corregido	661,397	17			

Nota: R al cuadrado = ,918

Tabla 17: Prueba Tukey tamaño de halo y tratamiento frente a *Staphylococcus aureus*

Tratamiento	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
75%	3	25,7367			
Trimetropin	3	27,1400	27,1400		
25%	3	27,5200	27,5200		
50%	3		32,6200	32,6200	
100%	3			35,3167	
Oxacilina	3				42,4100
Sig.		,900	,070	,640	1,000

Existe diferencia marcada entre los tratamientos propuesto con un sig de 0.000, donde el tratamiento con mayor capacidad frente a *Staphylococcus aureus*

es de 75% de concentración de aceite con un halo promedio de 25.74 mm superando al antibiótico trimetropin.

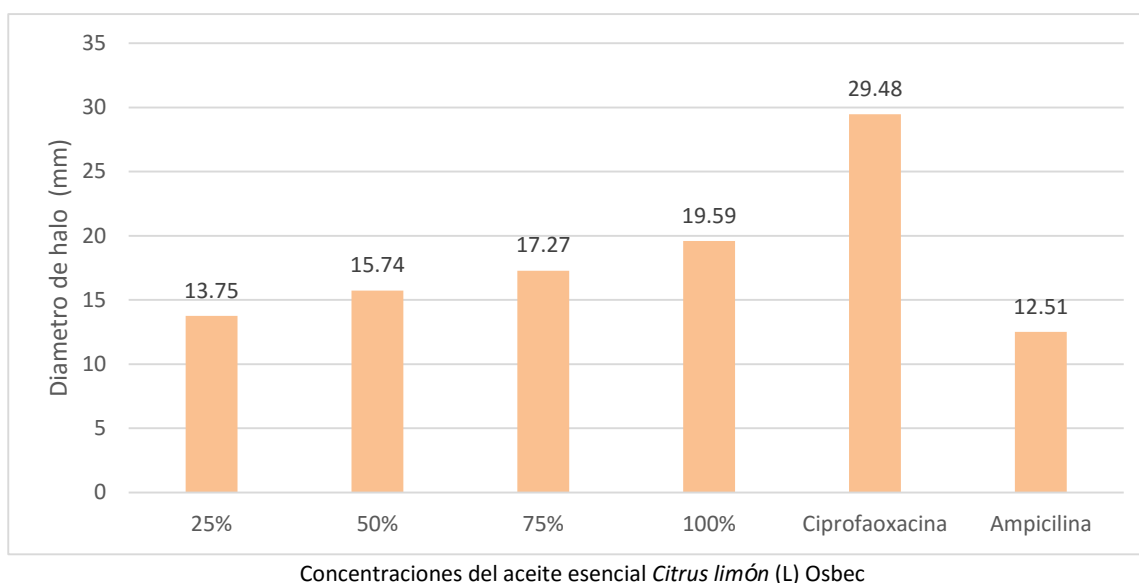
5.12. Sensibilidad Antimicrobiana, del aceite esencial de *Citrus limón* (L.) frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Tabla 18: Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana in vitro de aceite esencial de *Citrus limón* (L) Osbeck frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Tratamiento	Repetición I	Repetición II	Repetición III
25%	12.51	14.23	14.51
50%	15.4	16.57	15.24
75%	16.2	17.27	18.35
100%	19.59	19.59	19.59
Ciprofloxacina	29.18	29.5	29.76
Ampicilina	12.5	12.48	12.54

Nota: 100%= 55mg/mL

Figura 14: Comparación de tamaño promedio del halo según distintos tratamientos frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



En la tabla 18 se muestra los valores que representa el tamaño de los halos de inhibición es decir la zona alrededor de un disco en el que no se reproduce crecimiento bacteriano, se trabajó con concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% de aceite esencial *Citrus limón (L)* Osbeck y controles de ciprofloxacino y ampicilina, se realizó tres repeticiones, estos valores están representados en un diagrama de barras (figura14) en el que se observa que todas las concentraciones superan al tamaño del halo del control ampicilina mas no de ciprofloxacino, por lo que estas concentraciones inhiben a *Pseudomonas aeruginosa*, esta información es confirmada con las pruebas estadísticas de ANOVA Y TUKEY (tabla 17 y 18).

En la tabla 20 se observa que con un sig de 0.098 superior a 0.05 se acepta que la distribución de los diámetros de halo generado por *Pseudomonas aeruginosa* siguen distribución normal.

Tabla 19: Prueba de Kolmogorov-Smirnov para tamaño de halo de *Pseudomonas aeruginosa*

	N	Parámetros normales		Estadístico de prueba	Sig.	
		Media	Desv.			
residuos de ANOVA	3	18	-0.00056	1.02918	0.20306	,098

Tabla 20: Prueba ANOVA de tamaño promedio del halo acorde a los distintos tratamientos frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Origen	SC	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento	564,569	5	112,914	230,358	,000
Error	5.882	12	0.490		
Total, corregido	570,451	17			

Nota: R al cuadrado = ,990

Tabla 21: Prueba Tukey tamaño de halo y tratamiento según a los distintos tratamientos frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Tratamiento	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
Ampicilina	3	12,5067			
25%	3	13,7500			
50%	3		15,7367		
75%	3		17,2733		
100%	3			19,5900	
Ciprofloxacina	3				29,4800
Sig.		,315	,149	1,000	1,000

La ampicilina es el que menos inhibe a la *Pseudomona aeruginosa* con un halo de 12.51 mm promedio, el tratamiento que le sigue es el de concentración al 25% de un halo promedio de 13.75 mm todos los tratamientos de aceite esencial *Citrus limón* (L) Osbeck superaron al antibiótico ampicilina

Tabla 22: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a *Escherichia coli* ATCC 8739

Tiempo	TRATAMIENTOS									
	C+	C-	Puro	½	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
24h	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	2+
48h	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	2+

Nota: (-) 0 ufc/mL, (1+) <50,000 ufc/mL, (2+) 50,000-100,000 ufc/mL, (3+) >100,000 ufc/mL 1/2 = 855mg/mL

La CMI o efecto bacteriostático del aceite esencial de *Citrus limón* (L) Osbeck a diferentes diluciones sobre *Escherichia coli* ATCC 8739 se realizó en placas Petri utilizando controles positivos y negativos como se muestra en la tabla 19, los controles negativos indican que desde la dilución de 1/2 hasta 1/64 (13,58 mg/mL) a las 24 y 48 horas inhiben el crecimiento de *Escherichia coli* y el control positivo indica que a partir de la dilución 1/128 empiezan a crecer bacterias de *Escherichia coli*. Esto demuestra que las diluciones que están en el control negativo disminuye la carga bacteriana de *Escherichia coli*.

Tabla 23: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Tiempo	TRATAMIENTOS									
	C+	C-	Puro	1/2	¼	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
24h	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	1+
48h	3+	0	0	0	0	0	0	0	1+	2+

Nota: (-) 0 ufc/mL, (1+) <50,000 ufc/mL, (2+) 50,000-100,000 ufc/mL, (3+) >100,000 ufc/mL; ½=855mg/mL

La CMI o efecto bacteriostático del aceite esencial de *Citrus limón* (L) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, alcanzó a 1/32 (27.59 mg/mL) a las 48 horas, esto quiere decir que los controles negativos indican que desde la dilución de 1/2 hasta 1/32 a las 24 y 48 horas inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y el control positivo indica que a partir de la dilución 1/64 a las 48 horas empiezan a crecer bacterias de *Estaphylococcus aureus*. Esto demuestra que las diluciones que están en el control negativo disminuye la carga bacterial de esta bacteria.

Tabla 24: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Tiempo	TRATAMIENTOS									
	C+	C-	Puro	½	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
24h	3+	0	0	0	0	0	1+	2+	2+	3+
48h	3+	0	0	0	0	0	1+	2+	2+	3+

Nota: (-) 0 ufc/mL, (1+) <50,000 ufc/mL, (2+) 50,000-100,000 ufc/mL, (3+) >100,000 ufc/mL; 1/2 = 855 mg/mL

La CMI o efecto bacteriostático del aceite esencial de *Citrus limón* (L) sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, alcanzó a 1/8 (122.15 mg/mL) a las 24 y 48 horas. esto quiere decir que los controles negativos indican que desde la dilución de 1/2 hasta 1/32 a las 24 y 48 horas inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y el control positivo indica que a partir de la dilución 1/64 a ñas 48 horas empiezan a crecer bacterias de *Estaphylococcus aureus*. Esto demuestra que las diluciones que están en el control negativo disminuye la carga bacterial.

Tabla 25: Concentración Mínima Bactericida (CMB) o efecto bactericida frente a *Escherichia coli* ATCC 8739

Tiempo	TRATAMIENTOS								
	C+	C-	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
24h	1	0	0	1	1	1	1	1	1
48h	1	0	0	1	1	1	1	1	1

Nota: 0=Negativo 1=Positivo (turbidez) (1/2 =855mg/mL)

La CMB o efecto bactericida del aceite esencial de *Citrus limón* (L) sobre *Escherichia coli* ATCC 8739, se presenció a 1/2 (855 mg/mL) a las 24 y 48 Horas, esta determinación se realizó en tubos ensayo (fotografía 14), se utilizó controles negativos que por la transparencia indican la ausencia de bacterias y controles positivos que indican la presencia de bacterias, en la tabla 22 se observa que la bacteria es más resistente y que tiene efecto bactericida en la dilución 1/2 de y a partir de 1/4 hasta 1/128 ya empieza a aparecer esta bacterias, el indicador es la turbidez que aparece en los tubos de ensayo.

Tabla 26: Concentración Mínima Bactericida (CMB) o efecto bactericida frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Tiempo	TRATAMIENTOS								
	C+	C-	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
24h	1	0	0	0	1	1	1	1	1
48h	1	0	0	0	1	1	1	1	1

Nota: 0 = Negativo 1 = Positivo (turbidez) (1/2 = 855 mg/mL)

La CMB o efecto bactericida del aceite esencial de *Citrus limón (L)* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, se presencié a 1/4 (285mg/mL) a las 24 y 48 horas (fotografía 15), se utilizó controles negativos que por la transparencia indica la presencia de esta bacteria, en la tabla 23 se observa que la bacteria tiene efecto bactericida en la dilución 1/2 y de 1/4 y en las diluciones de 1/8 hasta 1/128 indica la presencia de esta bacteria por la turbidez en los tubos de ensayo.

Tabla 27: Concentración Mínima Bactericida (CMB) o efecto Bactericida frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Tiempo	TRATAMIENTOS								
	C+	C-	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
24h	1	0	0	0	1	1	1	1	1
48h	1	0	0	0	1	1	1	1	1

Nota: 0 = Negativo 1 = Positivo (turbidez) (1/2 = 855mg/mL)

La CMB o efecto bactericida del aceite esencial de *Citrus limón (L)* sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, se presencié a 1/4 (285 mg/mL) a las 24 y 48 horas (fotografía 16), se utilizó controles negativos que por la transparencia a la presencia de esta bacteria, en la tabla 24 se observa que la bacteria tiene efecto bactericida en la dilución 1/2 y de 1/4 y en las diluciones de 1/8 hasta 1/128 existe presencia de esta bacteria.

En cuanto a la evaluación del efecto antibacteriano revelan que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), para *E. coli*, fue de 13.58mg/mL, para *S. aureus*, de 27.59mg/mL y para *P.aeruginosa* de 122.15mg/mL. La Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *E. coli* fue de 855mg/mL, para *S.aureus* y *P. aeruginosa* fue de 285 mg/mL

CONCLUSIONES

1. La concentración del aceite esencial *Citrus limón* L. Osbeck fue de 0,315% (v/p).
2. Las características fisicoquímicas para el aceite esencial *Citrus limón* (L) Osbeck es: soluble en disolventes ligeramente polares, densidad (20°C) 0,8707 g/mL, índice de refracción (20°) 1,4783, rotación óptica 59,3 grados/dm.g/mL, índice de carbonilo 2,43 mg KOH/g de muestra, índice de saponificación menor a 0,01, índice de acidez 7,55 (mg KOH/g)
3. El análisis de la composición química del aceite esencial de *Citrus limón* (L) Osbeck según la cromatografía de gases-espectrometría de masas dio como resultado la identificación de 28 componentes, que representan el 96.13 % del total de aceites volátiles donde limoneno es el componente de mayor porcentaje 30,16% seguido del γ -terpineno con 12,41%, β -pineno 12,3%, p-cimeno 10,65%.
4. La CMB o el efecto bactericida frente a *Escherichia coli* se presentó a una dilución de 1/2 es decir 855g/mL a las 24 y 48 horas, en *Staphylococcus aureus* se presentó a la dilución de 1/4 es decir a 285 mg/mL a las 24 y 48 horas y para *pseudomonas aeruginosa* se presentó a una dilución de 1/4 es decir 285mg/mL a las 24 y 48 horas. Por tanto el aceite esencial *citrus limón* (L) Osbeck tiene efecto antimicrobiano frente a las tres cepas ATCC utilizadas en esta investigación.

RECOMENDACIONES

1. Desarrollar el efecto antimicrobiano frente a otros microorganismos ya que pueden considerarse para aplicaciones futuras.
2. El uso del *Citrus limón (L)Osbeck* procedente de la Región Cusco, Provincia de La Convención, Distrito de Echarate Illapani – Palma real debe ser utilizado con racionalidad para preservar la especie.
3. Después de haber hecho todos los análisis de rigor se puede decir que el aceite esencial *Citrus limón (L) Osbeck* procedente de la Región Cusco, Provincia de La Convención, Distrito de Echarate Illapani – Palma real es un antimicrobiano que puede ser utilizado en la industria alimentaria

BIBLIOGRAFIA

Aceq Laboratorios. (s.f.). Aceq Laboratorios Accesorios y Equipos. Obtenido de Vidriería de laboratorio: <https://aceqlaboratorios.com.co/producto/vidrieria/equipo-clevenger/>

Al-Jabri, N. N., & Hossain, M. A. (2018). Chemical composition and antimicrobial potency of locally grown lemon essential oil against selected bacterial strains. *Journal of King Saud University-Science*, 30(1), 14-20. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.08.008>

Al-Jabri, N., & Hossain, A. (2014). Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 247-253. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2014.10.011>

Argote , F., Suarez , Z., Tobar , M., Perez , J., Hurtado , A., & Delgado , J. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en staphylococcus aureus y escherichia coli. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 52-60. Doi:[https://doi.org/10.18684/bsaa\(15\).593](https://doi.org/10.18684/bsaa(15).593)

Aguirre, P., & Natali, J. (2017). Efecto del agente antimicrobiano del aceite esencial de canela y aceite esencial de limón en la cobertura comestible y el tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras y aceptabilidad general en rodajas de banano (*Musa Paradisiaca*). [Tesis para optar el Título de Ingeniera en Industrias Alimentarias, Universidad Privada Antenor Orrego]. Obtenido de: <https://repositorio.upao.edu.pe/handle/20.500.12759/2469>

Blas , F., & Fernández, T. (2021). Actividad antibacteriana del aceite esencial de cáscaras de Citrus sinensis (L.) Osbeck "Naranja" frente a Salmonella Typhimurium ATCC 14028 y Pseudomonas Aeruginosa ATCC 9027, In Vitro. Lima: [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, Universidad Maria Auxiliadora]. Obtenido de <https://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12970/475/ACTIVIDAD%20ANTIBACTERIANA%20DEL%20ACEITE%20ESENCIAL%20DE%20C%20%81SCARAS%20DE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Carson, F., Hammer, A., & Riley, V. (2015). Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. Clinical microbiology reviews, 19(1), 50-62. Doi: <https://doi.org/10.1128/cmr.19.1.50-62.2006>

Cvetkovikj, I., Stefkov, G., Acevska, J., Kulevanova, S., & Karapandzova, M. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of lemon essential oil (*Citrus limon* L.). Pharmacognosy Research, 7(1), 74. Doi: <https://doi.org/10.4103/0974-8490.147212>

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B.B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. Clinical Microbiology Reviews, 26(4), 822-880. Doi: <https://doi.org/10.1128/cmr.00022-13>

Da Silva, A. (2015). Determinación de la actividad antibacteriana de tres variedades de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck, *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación con *Citrus reticulata* y *Citrus medica* L.) Frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* 1. Universidad, Ciencia y Sociedad (30), 1-10. Obtenido de <https://www.uno.edu.ar/cuerpo-academico-uno/ingeniería>

quimica/departamento-de-humanidades/universidad-ciencia-y-sociedad.html

EcuRed. (s.f.). EcuRed. Obtenido de Limón:<https://www.ecured.cu/Lim%C3%B3n>

Fancello, F., Petretto, G. L., Marceddu, S., Venditti, T., Pintore, G., Zara, G., ... & Zara, S. (2020). Antimicrobial activity of gaseous Citrus limon var pompia leaf essential oil against *Listeria monocytogenes* on ricotta salata cheese. *Food microbiology*, 87, 1-39. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103386>

Gajdács, M., Ábrók, M., Lázár, A., & Burián, K. (2020). Differential epidemiology and antibiotic resistance of lactose-fermenting and non-fermenting *Escherichia coli*: Is it just a matter of taste? *Biología Futura*(71), 175–182. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s42977-020-00016-6>

Gajdács, M. (2019). The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 8(2), 52. Obtenido de: <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020052>

Gutiérrez, M., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter*(122), 35-41. Obtenido de <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Gutiérrez, M., Rúa, J., Caro, I., Arriaga, C. d., García, M., & Valle, P. d. (2012). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*, 26(2), 555-563. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.025>

Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into

pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*, 67(3), 159- 173. Doi: <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>

Hernández, C. (2014). Elaboración y caracterización de película comestible a base de quitosano y aceite esencial de limón. [Tesis para acreditar Experiencia Recepcional; Universidad Veracruzana]. Obtenido de: <https://docplayer.es/33973644-Programa-educativo-ingenieria-quimica-%20elaboracion-y-caracterizacion-de-pelicula-comestible-a-base-de-%20quitosano-y-aceite-esencial-de-limon-tesis.html>

Hosni, K., Zhed, N., Chrif, R., & Abid, I. (2022). Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence. *Food chemistry*, 123(4), 1098-1104. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.068>

Hynniewta M., Malik S., & Rao S. (2014). Genetic diversity and phylogenetic analysis of Citrus (L) from north-east India as revealed by meiosis, and molecular analysis of internal transcribed spacer region of rDNA. *Meta Gene*, 28(2), 237-251. doi:10.1016/j.mgene.2014.01.008.

Instituto Nacional del Cáncer. (s.f.). NIH. Obtenido de Cepa de organismos: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/cepa-de-organismos>

Institute of Medicine. (2004). *Food Chemicals Codex* (4ta edición ed.). Washington: International Academies Press.

Khan, A., Bashir, S., Ali, M., & Khan, S. R. (2019). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from Citrus limon L. (lemon) against human

pathogenic bacteria. *Journal of Food Safety*, 39(5), 220 - 226. Obtenido de:
<https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/369659>

Marreros, P. (2021). Evaluación y conocimiento de las propiedades antibacterianas de *Citrus sinensis* "Naranja", *Citrus reticulata* "Mandarina", *Citrus limón* "Limón" en la botica Mifarma-Chiclayo, [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico, Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt]. Obtenido de:<https://repositorio.uroosevelt.edu.pe/handle/20.500.14140/708>

Mehlenbacher, V., & Lasa, J. (1979). *Análisis de grasas y aceites*. Bilbao: Urmo.

Montalvo, P., & Rojas, D. (2021). Evaluación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de eucalipto y limón peruano en la conservación de carne de cerdo molida a temperatura de refrigeración. Pimentel: [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial y Comercio Exterior, Universidad Señor de Sipán]. Obtenido de <https://repositorio.uss.edu.pe/handle/20.500.12802/7719>

Oakman, A. (22 de abril de 2020). iStock. Obtenido de Flor de limón en un limonero Flor Blanca: <https://www.istockphoto.com/es/foto/flor-de-lim%C3%B3n-en-un-limonero-flor-blanca-gm1218654796-356180216>

Pérez, A., & Gomez, R. (2012). Study of acidity of zeolites in the isomerization reaction in the α -Pinene. *Ciencia y Desarrollo*, 4(1), 33-42. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/236231067_STUDY_OF_ACIDITY_OF_ZEOLITES_IN_THE_ISOMERIZATION_REACTION_INTHE_α-PINENE

Perez, O. (2003). Propuesta de un método para identificar y cuantificar psilocibina por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. México D.F.: [Tesina para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, Univesidad

- Nacional Autónoma de México]. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000317021>: <https://bibmacro-descubridor.dgb.unam.mx/Record/20.500.14330-TES01000317021/Details>
- Raspo, A., Vignola, B., Andreatta, E., & Juliani, R. (2020). Antioxidant and antimicrobial activities of citrus essential oils from Argentina and the United States. *Food Bioscience*, 36, 1-30. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100651>
- Rodríguez, M., Alcaraz, L., & Real, S. (2012). Procedimiento para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Obtenido de https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/540/1/rodriguez_m.pdf
- Sánchez , A., Torrescano , G., Camou , J., González , N., & Hernández , G. (2008). Sistemas combinados de conservación para prolongar la vida útil de la carne y los productos cárnicos. *Nacameh*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, 2(2), 124-159. Obtenido de <http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/>
- Siancas, J. (2021). Determinación de la presión de vacío óptima para mejorar el rendimiento y la calidad del aceite esencial de Limón sutil (*Citrus Aurontifolia*) obtenido por hidroestilación . Piura : Tesis para optar el título de Ingeniero Químico, Universidad Nacional de Piura .
- Silva , A. (2015). Determinación de la actividad antibacteriana de tres variedades de limón. *Universidad, Ciencia y Sociedad*(14), 30-38. Obtenido de http://revistasbolivianas.umsa.bo/scielo.php?pid=S8888-88882015000100006&script=sci_arttext&tIng=es
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Yadav, M. P. (2021). Insights into the chemical

composition and bioactivities of citrus peel essential oils. *Food Research International*, 143, 1-19. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110231>

Tam, J. (2015). Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de cáscara de citrus limón (limón) sobre staphylococcus aureus meticilino resistente 2015. [Tesis para optar el título de Médico Cirujano, Universidad Privada Antenor Orrego]. Obtenido de: <http://repositorio.upao.edu.pe/handle/20.500.12759/1710>

The University of Arizona. (2016). Campus Arboretum. Obtenido de Citrus aurantiifolia: <https://apps.cals.arizona.edu/arboretum/taxon.aspx?id=683>

Torrenegra, E., Pájaro, P., & Méndez, L. (2017). Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género Citrus. *Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas*, 46(2), 160-175. Obtenido de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152015000300011&script=sci_arttext

Tong, S., Davis, S., Eichenberger, E., Holland, L., & Fowler, G. (2015). Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603-661. Doi: <https://doi.org/10.1128/cmr.00134-14>

Urrunaga, M., del Carpio, C., Gutierrez, G., & Tomaylla, C. (2022). Propiedades fisicoquímicas, composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de Citrus jambhiri (Limón rugoso). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 88(3), 277-288. Obtenido de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2022000300277&script=sci_arttext

Vignola M., Serra M., Andreatta A. (2020). Actividad Antimicrobiana de Diversos Aceites Esenciales en Bacterias Benéficas, Patógenas y Alterantes de

Alimentos. *Revista Tecnología y Ciencia*, 18(33), 1-39. Doi:
<https://doi.org/10.33414/rtyc.37.92-100.2020>

Villamizar, M., & Aular, Y. (2022). Métodos de extracción del aceite esencial de lippia alba. *Revista Ingeniería UC.*, 29(1), 3–14. Doi:
<https://doi.org/10.54139/revinguc.v29i1.90>.

ANEXO

Anexo 1: Matriz de Consistencia

Problema general	Objetivo general	Hipótesis	Variables e indicadores	Metodología- Tipo de investigación
<p>¿Cuál es la composición química aceite esencial del <i>Citrus limón</i> (L) Osbeck y su efecto antimicrobiano sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i>?</p> <p>Problemas específicos</p> <p>¿Sera posible obtener una concentracion favorable del aceite esencial <i>Citrus limón</i> (L) Osbeck para determinar su composicion quimica?</p> <p>¿Cuáles son las características fisicoquímicas del aceite esencial <i>Citrus limón</i> (L) Osbeck ?</p> <p>¿Cuál será la composicion química del aceite esencial <i>Citrus limón</i> (L) Osbeck ?</p> <p>¿Cuál será su efecto antimicrobiano sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i> ?</p>	<p>Determinar la composición química y su efecto antimicrobiano del aceite esencial <i>Citrus limón</i> (L)Osbeck sobre las cepas ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i></p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>Determinar la concentración del aceite esencial <i>Citrus limón</i> (L) Osbeck por el método de hidrodestilacion en trampa de Clevenger</p> <p>Caracterizar las propiedades físico-químicas del aceite esencial <i>Citrus limón</i> (L) Osbeck, considerando parámetros: solubilidad, densidad, índice de refracción, polarimetría, índice de carbonilo, índice de saponificación y índice de acidez.</p> <p>Determinar la composicion química por cromatografía de gases-espectrometría de</p>	<p>El aceite esencial <i>Citrus limón</i> (L) Osbeck tiene una composición química que le confiere propiedades antimicrobianas y es efectivo contra las cepas ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i> lo que lo convierte en un potencial conservante natural en la industria alimentaria</p>	<p>Variable Independiente</p> <p>Aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus limón</i> (L) Osbeck</p> <p>Variable Dependiente</p> <p>Actividad antimicrobiana frente a las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739</p> <p>Indicadores</p> <p>Aceite esencial en concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25%, 12.5% diluidas en etanol absoluto. Medición del diámetro de halos de inhibición (mm)</p>	<p>Hidro destilacion – trampa de Clevenger para la obtención del aceite esencial <i>Citrus limón</i> (L) Osbeck</p> <p>Activacion de cepas ATCC, Determinación de la concentración mínima inhibitoria, Determinación de la concentración mínima bactericida Sensibilidad antimicrobiana según método de pozo excavado</p> <p>Tipo de Investigación</p> <p>Experimental Explicativa</p>

masa de la fracción volátil del aceite esencial *Citrus limón* (L) Osbeck. Evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial *citrus limón* (L) Osbeck a diferentes concentraciones frente a las cepas ATCC *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* comparados con patrones de trimetopin, oxacilina, ampicilina y ciprofloxacino a través de la CMI, CMB y sensibilidad antimicrobiana por el método de pozo excavado.

Anexo 2: Medios de verificación

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO		
• APARTADO POSTAL N° 803 - Cusco - Perú	• CIUDAD UNIVERSITARIA Av. de la Cultura N° 733 Teléfonos: 22861 - 22812 - 22378 - 23233 - 23228	• MUSEO E INSTITUTO DE ARQUEOLOGÍA Calle del Almirante 5° 101 - Teléfono: 223260
• FAX: 238156 - 238173 - 222812		• CENTRO AGRÓNOMICO K'AYRA San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 271499 - 271483
• RECTORADO Calle Tigré N° 137 Teléfonos: 222270 - 234891 - 224881	• LOCAL CENTRAL Plaza de Armas s/n Teléfonos: 223371 - 225721 - 254833	• COLEGIO "FORTUNATO L. HERBERA" Av. de la Cultura N° 721 "Escuela Universitaria" - Teléfono: 227182

HERBARIO VARGAS (CUZ)

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N° 0 14-2019-HVC-FCB-UNSAAC

La directora del Herbario Vargas (CUZ) -Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), deja constancia que: la señora **Ana Cecilia Tupayachi Palomino**, docente de la Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, egresada de la **Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos**, ha presentado a la Dirección del Herbario Vargas CUZ dos muestras vegetales herborizadas para su determinación taxonómica (expediente N°003072), para el proyecto de tesis intitulado "**Composición química y efecto antimicrobiano del aceite esencial del *Citrus limon* (Linneo) N. L. Burman sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli***", La que al ser diagnosticada por el M.Sc. Isan Huamantupa Chuquimaco, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada, y comparación con muestras del Herbario, concuerdan con la clasificación del grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group-APG IV, 2016).

N°	FAMILIA	ESPECIES
1	Rutaceae	<i>Citrus limon</i> (L.) Osbeck
2	Rutaceae	<i>Citrus limon</i> (L.) Osbeck

Se le expide la presente certificación a petición formal de la interesada para los fines que visaran por conveniente.

Cusco, 24 de Julio del 2019


Bga. María Luisa Ochoa Cámara
Directora del Herbario Vargas (CUZ)



Anexo 3: Índice de carbonilo

UNE 84162 – ACEITES ESENCIALES (Determinación del índice de carbonilo – Método de la hidroxilamina libre)

C. Procedimiento para la determinación del contenido de carbonilo expresado como citral

- 1. Preparación Soluciones Alcohólicas:** A partir de alcohol de 96 °GL se preparar una disolución para concentraciones de 60°GL y 95°GL., empleando para la medición un alcoholímetro.
- 2. Preparación Solución KOH 0,5 N:** Esta preparación es distinta para los aceites esenciales ya que la normalidad (0,5 N) es alcanzada por adición de Etanol a 60°GL. En una fiola de 250 ml agregar la cantidad de hidróxido de potasio (en lentejas) y aforar con la solución de etanol ya preparada.
- 3. Preparación Solución de clorhidrato de hidroxilamina:** Se pesaron 3,6 g de cloruro de hidroxilamina, el cual fue agregado en una fiola de 100 ml, posterior a esto se adiciono 39,25 ml de agua destilada, después se aforó con alcohol de 95°, quedando preparada para la valoración.
- 4. Preparación de la muestra de aceite esencial:** Cuidadosamente se midió con exactitud 1ml de aceite esencial de hierba luisa en una pipeta, el contenido se agregó en un matraz de 200 ml. Se añaden 10 ml de solución de clorhidrato de hidroxilamina y unas gotas de los indicadores azul de bromofenol y naranja de metileno.
- 5. Valoración:** La muestra de aceite esencial se valora con KOH 0,5 N, dando un movimiento circular al matraz para apreciar el viraje hasta un cambio de color verde.
- 6. Los cálculos son los siguientes:**

$$\text{Citral (p/v)} = (0,0761 \times (VKOH \times f \text{ KOH})) \times 100$$

Donde:

V: volumen de KOH gastados

f: factor de corrección

41.1.18

AOAC Official Method 920.160
Saponification Number
(Koettstorfer Number) of Oils and Fats
Titrimetric Method
Final Action

A. Reagent

Alcoholic potassium hydroxide solution [JAOAC 19, 427(1936)].—(1) Reflux 1.2 L alcohol 30 min in distilling flask with 10 g KOH and 6 g granulated Al (or Al foil). Distil and collect 1 L after discarding first 50 mL. Dissolve 40 g KOH in this 1 L alcohol, keeping temperature <15° while dissolving alkali. Keep solution in glass-stoppered bottle. Or, (2) crush 40 g KOH in 185 mm mortar. Add 45 g granulated CaO and grind mixture to powder. From 1 L alcohol add 100 mL to mortar and transfer to flask, rinsing mortar with several more portions. Add remainder of alcohol to flask, shake mixture ≥5 min, and invert beaker over neck of flask. Repeat shaking several times during day. Next morning filter solution into clean, dry, glass-stoppered bottle.

B. Determination

Accurately weigh ca 5 g filtered sample into 250–300 mL Erlenmeyer. Pipet 50 mL alcoholic KOH solution into flask, draining pipet definite time. Connect flask with air condenser and boil until fat is completely saponified (ca 30 min). Cool, and titrate with 0.5N HCl, 936.15 (see A.1.06), using phenolphthalein. Conduct blank determination along with that on sample, using same pipet for measuring KOH solution and draining same time.

Calculate saponification number (mg KOH required to saponify
1 g fat) = $28.05 (B - S)/g$ sample

where B = mL 0.5N HCl required by blank and S = mL 0.5N HCl required for sample.

Anexo 5: Índice de Acidez

33.6.08

AOAC Official Method 969.17

Acid Value of Butterfat

Titrimetric Method

First Action 1969

Final Action 1974

IDF-ISO-AOAC Method

Codex-Adopted—AOAC Method*

A. Definition and Principle

Acid value of fat from butter = mg KOH required to neutralize 1 g fat. Fat separated by melting butter, is dissolved in alcohol-ether mixture, and titrated with standard alkali.

B. Reagents

(a) *Alcoholic potassium hydroxide standard solution.*—0.1N. Use absolute alcohol or alcohol denatured with methanol.

(b) *Alcohol-ether mixture.*—Equal volumes alcohol (or alcohol denatured with methanol) and ether. Add 0.3 mL phenolphthalein solution, (c)/100 mL mixture and add alcoholic KOH solution, (a), to faint pink.

(c) *Phenolphthalein solution.*—1% in alcohol or alcohol denatured with methanol.

C. Determination

Weigh, to nearest mg, 5–10 g well-mixed sample **920.118** (see 33.6.07), into 250–300 mL Erlenmeyer. Add 50–100 mL alcohol-ether mixture and 0.1 mL phenolphthalein solution. Titrate with 0.1N alcoholic KOH until permanent faint pink appears and persists for 10 s.

Acid value = mL alcoholic KOH solution × normality alcoholic KOH solution × 56.1/g sample. Difference between duplicate determinations should be 0.1 mg KOH/g fat.

Reference: JAOAC **52**, 235, 394(1969).

* Adopted as a Codex Reference Method (Type II) for titrimetry of fat acidity in milkfat products & butter.

Anexo 6: Registro fotográfico

Fotografía 1. *Muestra recolectada*



Fotografía 3. *cáscara de Citrus limón L Osbeck*



Fotografía 2. *Picado y secado de las cáscaras de limón arrastre de vapor*



Fotografía 4. *Equipo de destilación por Clevenger*



Fotografía 5. Vial para guardar el aceite esencial a 4°C

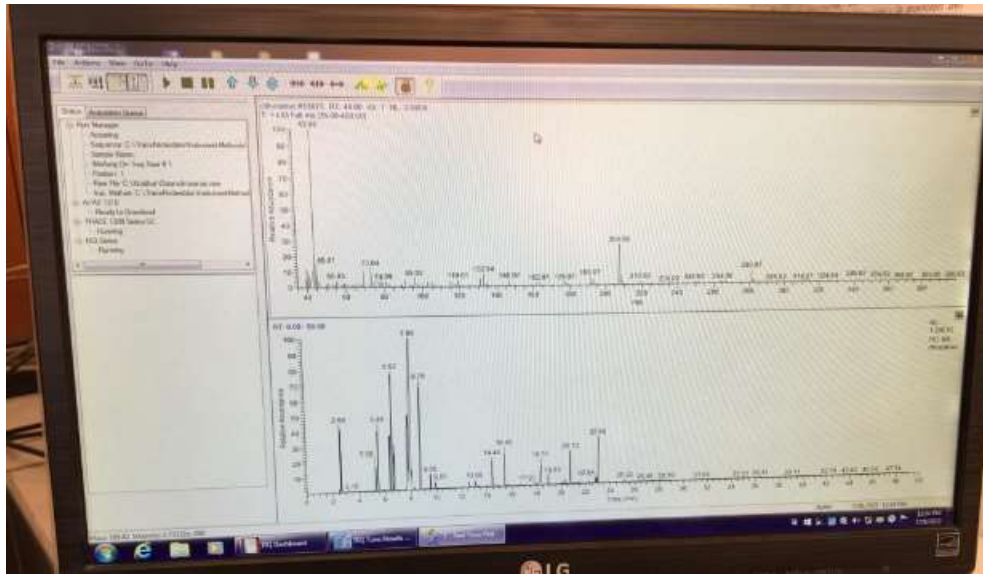


Fotografía 6. Equipo de CG-E



Fotografía 7. Cromatograma en el equipo de CG-EM





Fotografía 8. Procedimientos microbiológicos





Fotografía 9. Cepas ATCC utilizadas



Fotografía 10. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a *Escherichia coli* ATCC 873



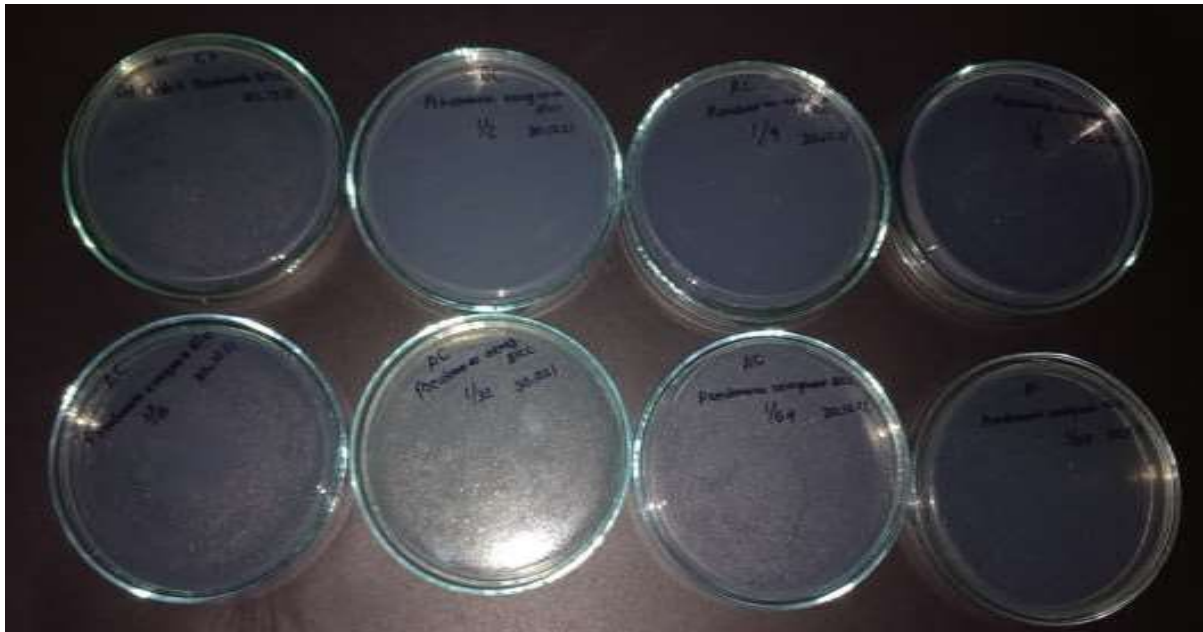
Fotografía 11. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538



Fotografía 12. Efecto bacteriostático de aceite esencial de *Citrus limon* (L.) frente a *S. aureus*



Fotografía 13. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



Fotografía 14. Concentración Mínima Bactericida (CMB) o Efecto Bactericida frente a *Escherichia coli* ATCC 8739



Fotografía 15. Concentración Mínima Bactericida (CMB) o Efecto Bactericida frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538



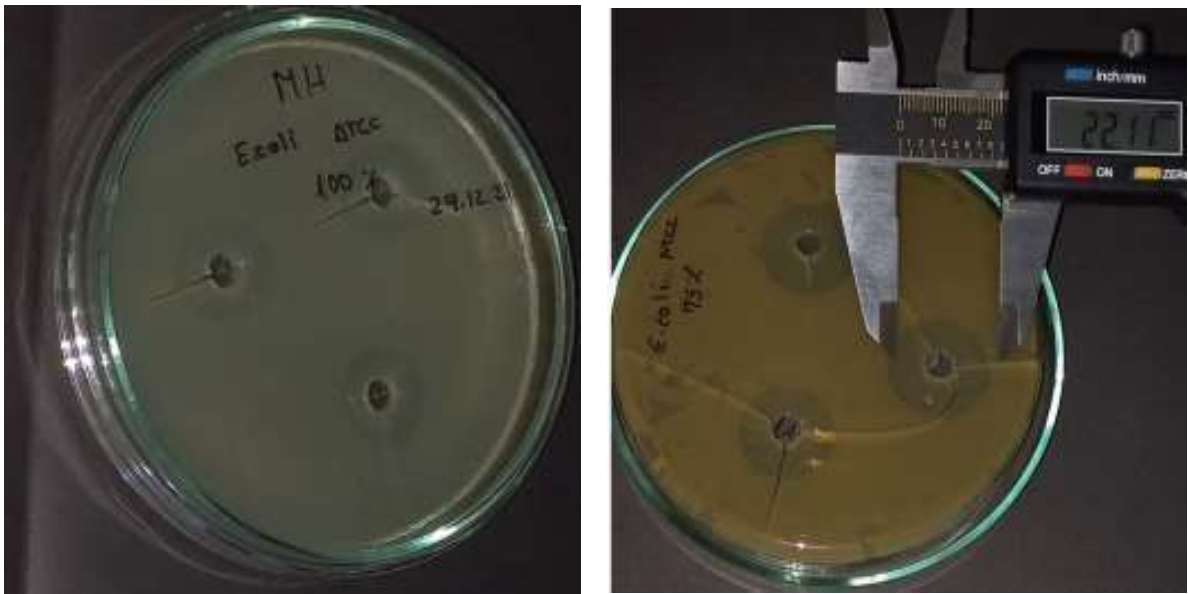
Fotografía 16. Concentración Mínima Bactericida (CMB) o Efecto Bactericida frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

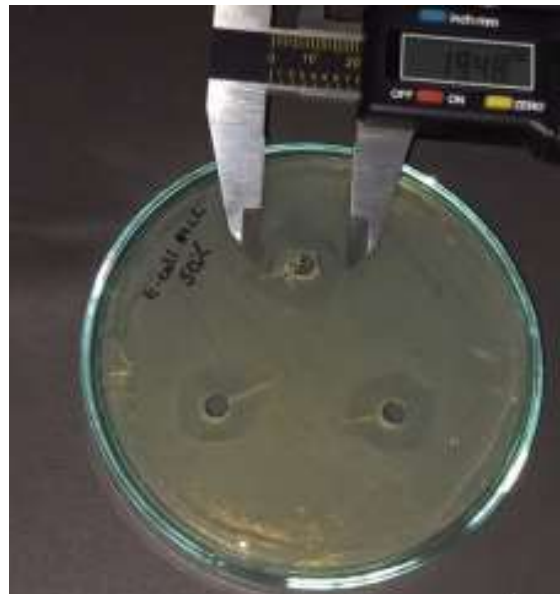
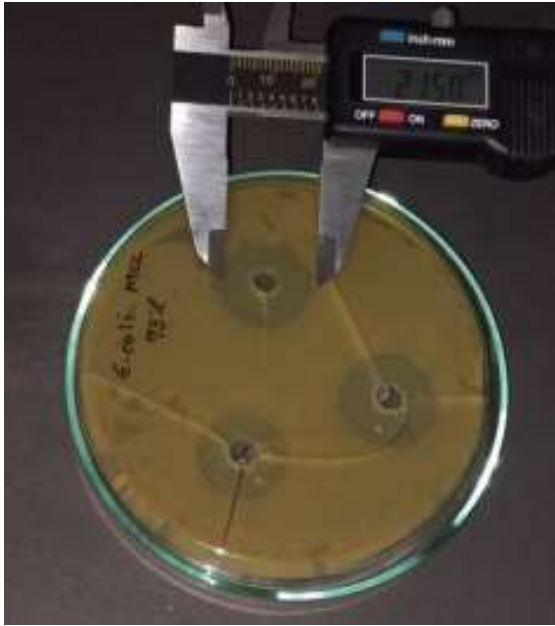


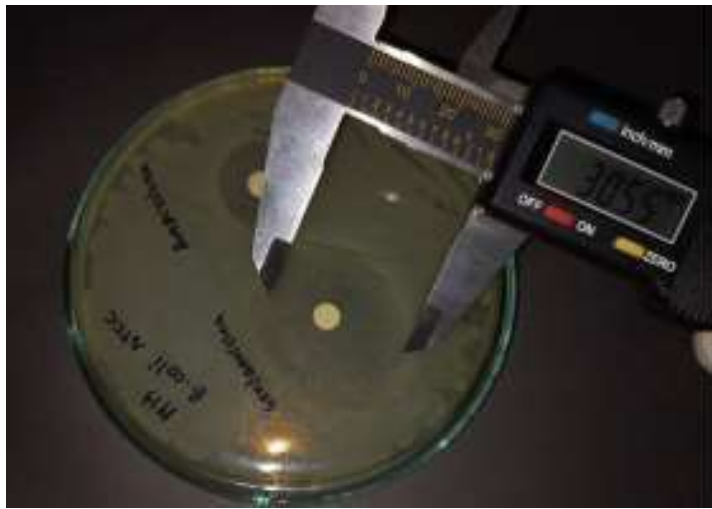
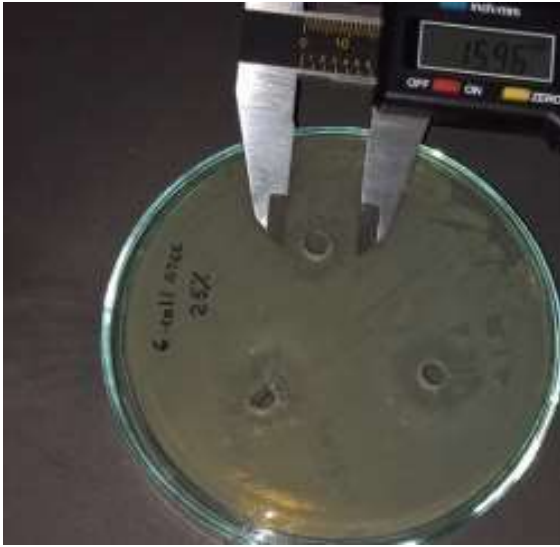
Fotografía 17. Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana in vitro de aceite esencial de *Citrus limon* (L.) frente a *Escherichia coli* ATCC 8739



Fotografía 18. Halo de inhibición de aceite esencial de *Citrus limon* (L.) frente a *E. coli* ATCC 8739



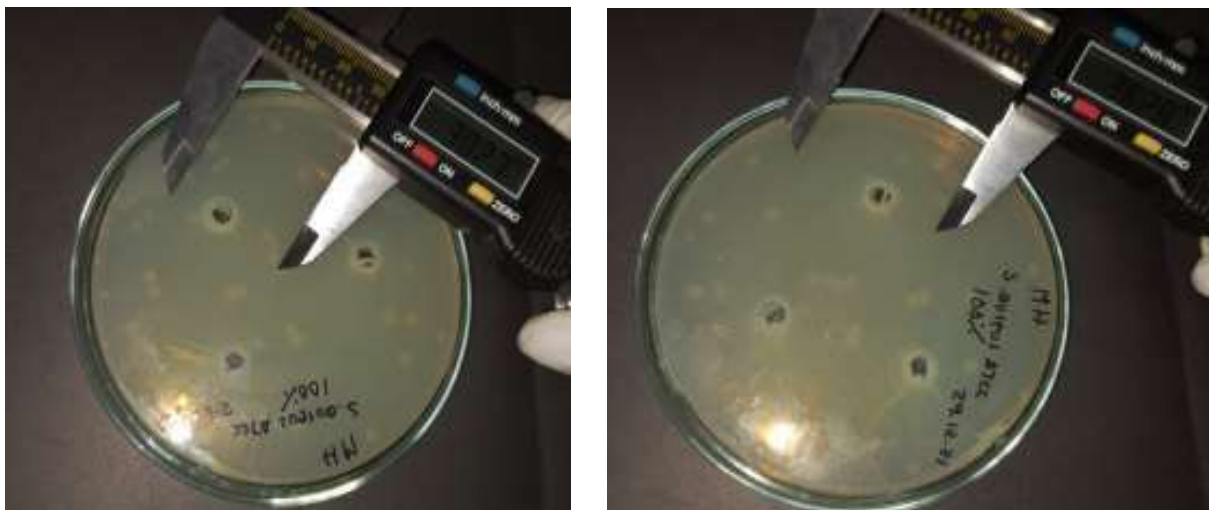




Fotografía 19. Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana in vitro de aceite esencial de *Citrus limon* (L.) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538



Fotografía 20. Halo de inhibición de aceite esencial de *Citrus limon* (L.) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538







Fotografía 21. Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana in vitro de aceite esencial de *Citrus limon* (L.) frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



Fotografía 22. Halo de inhibición de aceite esencial de *Citrus limon* (L.) frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027







Prueba de normalidad

Tabla 28 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		residuos de ANOVA 1	residuos de ANOVA 2	residuos de ANOVA 3
N		18	18	18
Parámetros normales ^{a,b}	Media	0.00056	0.00056	-0.00056
	Desv. Desviación	1.02994	1.02900	1.02918
Máximas diferencias extremas	Absoluto	0.193	0.218	0.203
	Positivo	0.188	0.161	0.199
	Negativo	-0.193	-0.218	-0.203
Estadístico de prueba		0.193	0.218	0.203
Sig. asintótica(bilateral)		,125 ^c	,074 ^c	,098 ^c