



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

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*

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO

AUTORES

BACH. BLAS ESPINOZA, FREDY EDGARD

BACH. FERNANDEZ VENTURO, THALIA MERCEDES

ASESOR

MG. BRAVO ARAUJO, GLORIA TULA

LIMA – PERÚ

2021

DEDICATORIA

A mis padres por siempre brindarme su apoyo y por creer en mí aun en los momentos difíciles

A mis hijos que son la razón de mi incansable esfuerzo y en quienes siempre puedo encontrar motivos para continuar y ser mejor persona cada día.

Fredy Edgard Blas Espinoza

La tesis se la dedico en primer lugar a Dios, por permitirme seguir logrando cada paso que doy en mi carrera profesional, por guiarme e iluminar mi camino. A mis padres Ysabel Venturo y Celso Fernandez que son lo más valioso que tengo en la vida, por brindarme todo su apoyo y confianza para lograr cada meta trazada, por enseñarme a seguir adelante y no rendirme fácilmente.

Thalia Mercedes Fernandez Venturo

AGRADECIMIENTO

A Dios nuestro padre todopoderoso por darnos salud y las fuerzas necesarias para poder seguir adelante y poder cumplir cada proceso de nuestra carrera profesional, por guiarnos por el buen camino afrontando cada obstáculo que se nos pueda presentar.

A nuestros padres y hermanos por todo el apoyo que nos brindaron para alcanzar este gran objetivo, a la Universidad María Auxiliadora por brindarnos la oportunidad de poder cumplir con el objetivo de culminar la carrera profesional, a la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica en la cual tuvimos el apoyo de excelentes docentes y que con su gran apoyo pudimos culminar este proceso académico.

A nuestra asesora, Mg. Sc. Gloria Tula Bravo Araujo, por la experiencia y los conocimientos brindado los cuales nos permitieron desarrollar exitosamente nuestra tesis; al Q.F. Edgar Manrique Tapia por el apoyo a lo largo de todo este proceso, por sus conocimientos y la disposición para poder ejecutar el presente trabajo.

Índice General

	Páginas
Resumen	viii
Abstract	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1 Enfoque y diseño de la investigación	10
2.2 Población, muestra y muestreo	11
2.3 Variables de investigación	11
2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	12
2.5 Proceso de recolección de datos	12
2.6 Métodos de análisis estadístico	17
2.7 Aspectos éticos	17
III. RESULTADOS	18
IV. DISCUSIÓN	24
4.1 Discusión de resultados	24
4.2 Conclusiones	29
4.3 Recomendaciones	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXOS	40

Índice de Tablas

Tabla 1. Ensayo de miscibilidad del aceite esencial <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja”	18
Tabla 2. Análisis Químico del aceite esencial	19
Tabla 3. Densidad relativa del aceite esencial	21
Tabla 4. Rendimiento del aceite esencial <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja”	20
Tabla 5. Resultado promedio de las mediciones de los halos de inhibición (mm) del aceite esencial de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja”	21
Tabla 6. Estadísticos descriptivos de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja”. frente a <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.	21

Índice de Anexos

Anexo A. Operacionalización de la variable	40
Anexo B. Instrumento de recolección de datos	41
Anexo C. Clasificación taxonómica	42
Anexo D. Evidencias fotográficas del trabajo de campo	43
Anexo E. Informe del análisis de la actividad antibacteriana	50
Anexo F. Ficha Técnica Microbiológica	51
Anexo G: Matriz de Consistencia	53

RESUMEN

Objetivo: Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, in vitro.

Métodos: Se realizó el método de hidrodestilación para obtener el aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, además se realizaron ensayos preliminares como la determinación del porcentaje, rendimiento de extracción, densidad mediante picnometría y la miscibilidad del aceite esencial. La actividad antibacteriana se evaluó según el método de difusión en agar a concentraciones de 100, 75, 50 y 25% frente a las cepas *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, se utilizó como control positivo a neomicina sulfato a concentración de 0.2 mg/mL y como control negativo el dimetilsulfoxido.

Resultado: El rendimiento del aceite esencial fue de 0.45 % con una densidad relativa de 0.86, miscible en etanol, cloroformo, n-hexano y éter de petróleo. El aceite esencial no presentó actividad antibacteriana significativa frente a las cepas *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Conclusiones: El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” no presentó actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Palabras claves: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, metabolitos secundarios, hidrodestilación, aceite esencial, actividad antibacteriana, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Objective: To determine the antibacterial activity of the essential oil of the peels of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck "orange", against *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, in vitro.

Methods: The hydrodistillation method was carried out to obtain the essential oil from the *Citrus sinensis* (L.) Osbeck "orange peels, in addition, preliminary tests were carried out such as the determination of the extraction yield percentage, density by pycnometer and the miscibility of the essential oil. The antibacterial activity was evaluated according to the agar diffusion method at concentrations of 100, 75, 50 and 25% against the strains *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, neomycin sulfate was used as a positive control at 0.2 mg / mL and dimethyl sulfoxide as a negative control.

Result: The essential oil yield was 0.45% with a relative density of 0.86, miscible in ethanol, chloroform, n-hexane and petroleum ether. The essential oil did not show significant antibacterial activity against the strains *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Conclusions: The essential oil from the skins of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck "orange" does not show antibacterial activity against *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Key words: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck "orange", secondary metabolites, hydrodistillation, essential oil, antibacterial activity, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*

I. INTRODUCCIÓN

Las constantes evoluciones bacterianas junto a la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos durante los últimos años han puesto en grave peligro la salud pública de las personas en el mundo¹. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2017 estimó que para el año 2050 las infecciones multibacterianas, causadas por dos o más especies bacterianas, causarán más muertes que el cáncer². Además, el uso indiscriminado e incontrolado de agentes antiinfecciosos es recurrente haciendo que la eficacia de las intervenciones para el control y tratamiento de enfermedades infecciosas se vean seriamente afectadas y, en consecuencia, crear un impacto negativo en la economía global. La resistencia bacteriana cruzada comprende diferentes eventos evolutivos de adaptación a los antibióticos, o cualquier otro agente antiinfeccioso, que disminuye la sensibilidad del organismo a múltiples fármacos³. Diversos estudios como el desarrollado por Wang y colaboradores, han discutido la resistencia bacteriana a los agentes antiinfecciosos, incluidos los antisépticos, desinfectantes y antibióticos comúnmente utilizados en el entorno hospitalario, lo cual muestra el gran desafío que plantea la resistencia cruzada en la actualidad⁴.

Además, la capacidad de las bacterias patógenas para formar biopelículas representa una situación crítica en la parte clínica. Se ha observado resistencia cruzada a múltiples fármacos en biopelículas bacterianas. Se ha descrito como un mecanismo de defensa multifactorial involucrado en la virulencia de las cepas bacterianas que dificulta su erradicación y también presenta nuevas interrogantes en la patogénesis, la transmisión y la resistencia. El uso terapéutico de compuestos antiinfecciosos para tratar infecciones resistentes a múltiples fármacos se ha visto seriamente comprometido, esto a causa de la adaptación del patógeno al sistema inmunitario del huésped. La exposición de cepas bacterianas a medicamentos terapéuticos que imitan los componentes del sistema inmunitario, por ejemplo, pueden reducir la efectividad de estos medicamentos frente a cepas que ya han estado expuestas a los componentes del sistema inmunitario del individuo. Esta exposición con frecuencia conduce a modificaciones en la membrana bacteriana o incluso a la secreción de una matriz extracelular, lo que facilita la formación y protección de biopelículas, que pueden asociarse con eventos de resistencia cruzada⁵. Como una estrategia alternativa prometedora para controlar el fenómeno

de resistencia cruzada, la quimioterapia combinada de dos o más compuestos antiinfecciosos (sinergia) se ha abordado de manera destacada para el tratamiento de infecciones complejas, incluidas enfermedades respiratorias, que a menudo involucran cepas tanto virales como bacterianas⁶. Además, la aplicación de compuestos capaces de actuar sobre diferentes objetivos bacterianos, tales como fenoles, terpenos y aldehídos (p-mentha-1 (7), 3-dieno; Limoneno; Linalol; Decanal; ácido n-hexadecanoico entre otros), que actúan alterando la concentración de ácidos grasos en la membrana celular microbiana, provocando daños en su estructura y la integridad de la misma^{7,8}.

Las cáscaras de *Citrus sinensis* (L) Osbeck “naranja” son utilizadas comúnmente en la medicina tradicional para mantener la salud bucodental y tratar la halitosis, también en condiciones crónicas como el asma, enfermedades pulmonares, tumores, afecciones de la piel, dismenorrea, fiebre, dolores de cabeza, ictericia, vómitos, hemorroides, estreñimiento, disentería, trastornos intestinales e infestaciones por lombrices. Otra actividad terapéutica reportada es la hipolipidémica siendo esta atribuida a la presencia de sus metabolitos secundarios, también posee actividad antiacné por la presencia de flavonoides, actividad antifúngica por su contenido de limonina, y actividad anticancerígena dado que contiene flavonoides, flavonas y flavanonas, las cuales se encuentran presentes en el género citrus⁹.

Por lo tanto, considerando el escenario crítico que surge de la resistencia cruzada bacteriana tanto en el entorno hospitalario como en la comunidad y tomando en cuenta las propiedades beneficiosas que presenta el aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L) Osbeck “naranja”.

Los aceites esenciales de cítricos (AEC) son compuestos aromáticos volátiles, generalmente presentes en las cáscaras de los cítricos en una concentración promedio de 0.6% y 3.8% en base seca, obteniéndose por prensado mecánico en frío o por destilación hidráulica como métodos más comunes. Se ha reportado que los AEC ofrecen diversos beneficios para la salud y el bienestar humano debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Los AEC son una buena fuente de compuestos bioactivos de importancia medicinal. Los beneficios que tienen los AEC para la salud son atribuidos principalmente a la presencia de ácidos fenólicos

y flavonoides. Los flavonoides de los cítricos son poderosos antioxidantes y potentes captadores de radicales libres, que ayudan en la prevención de enfermedades que ocurren debido a especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, los flavonoides de los cítricos muestran propiedades beneficiosas para la salud que incluyen actividades antioxidantes, cardioprotectoras, anticancerígenas y antiinflamatorias. Los glucósidos de flavonona (hesperidina y naringina) presentes en la AEC poseen fuertes actividades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas, detallados por Ashall y Sheltawy¹⁰. Benavente y Castilla detallan que las flavonas polihidroxiladas presentes en los AEC son conocidos por su amplia gama de actividades biológicas como propiedades neuroprotectoras, cardioprotectoras, antiateroesclerosis, antimutagénicas, antiinflamatorias, antialérgicas, antioxidantes y antitumorales¹¹.

Los AEC comprenden al menos de 20 a 60 variedades de diferentes compuestos. El aceite esencial predominante detectado en las cáscaras de cítricos es el limoneno. El género cítrico acumula una amplia gama de flavononas específicas de especies (hesperidina, naringina y neohesperidina), flavonas (apigenina, diosmetina y luteolina), polimetoxiflavanonas (nobiletina, sinensetina y tangeretina) y antocianinas (derivados de cianidina y delphinidina). A pesar de ser considerados agentes con escaso valor nutritivo, los flavonoides cítricos poseen múltiples beneficios para la salud como, antimicrobiano, antioxidante y antiinflamatorio, detallados por Suntar et al¹².

Además, se resalta la presencia de limoneno como el agente mayoritario con actividad frente a diversas cepas de patógenos como, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella entérica*, reportados por Settani¹³.

Las cáscaras de naranja han sido ampliamente empleadas como medicina tradicional para tratar diversas afecciones frecuentes dentro de la comunidad, sobre todo en procesos inflamatorios de la piel, problemas digestivos, infecciones del tracto respiratorio, dolores musculares, hipertensión e infecciones por tiña, reportados por Li y colaboradores en el año 2008¹⁴.

Se ha demostrado particularmente que la cáscara de mandarina tiene actividad antibacteriana contra el microorganismo causante del acné (*Cutibacterium acnes*), según Huo¹⁵.

El extracto alcohólico de piel de naranja (*C. reticulata*), mostró fuertes actividades antioxidantes y anti-enzimáticas *in vitro* (inhibición de colagenasa y elastasa hasta en un 76 y 80%, respectivamente), esto sugiere que podría ser de gran ayuda en el cuidado de la piel, esto debido a su potente capacidad antienviejimiento, reportados por Apraj y Pandita¹⁶. El extracto etanólico de piel de naranja se puede utilizar como remedio natural a través de formulaciones contra los patógenos de la caries dental (*Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*), debido al potencial terapéutico y antimicrobiano que posee, reportado por Shetty¹⁷.

El extracto que se obtiene de las cáscaras de limón ayuda a prevenir y manejar las calcificaciones que frecuentemente se forman en el sistema urinario, este efecto benéfico se logra al inhibir la formación de concreciones pedregosas de oxalato de calcio y brindar protección al tracto urinario contra el daño inducido por cálculos, evaluado por Sridharan y colaboradores en el año 2015¹⁸.

Los microorganismos han logrado desarrollar algunos mecanismos estrictos para escapar de los efectos letales de las sustancias antimicrobianas. Naturalmente, la mayoría de los antibióticos son producidos por microbios como bacterias saprofitas u hongos ambientales, otros son antibióticos sintéticos modificados, mientras que algunos son completamente sintéticos como son las fluoroquinolonas y las sulfonamidas¹⁹.

Muchos organismos han logrado desarrollar fenómenos defensivos contra las sustancias utilizadas como antimicrobianos, siendo capaces de causar alteraciones en el sitio objetivo, inhibición de la entrada, la distribución de fármacos y producción de enzimas que pueden degradar los antimicrobianos y hacer nulo el efecto terapéutico que se esperaba desarrollara. En este sentido, la resistencia a los antibióticos puede simplemente representar la competencia darwiniana de los elementos antimicrobianos derivados de microbios naturales²⁰.

El análisis metagenómico funcional de los microbios del suelo ha revelado una amplia diversidad en los determinantes genéticos asociados con la resistencia a los antibióticos. Aunque se ha informado muy poco en patógenos humanos sobre este aspecto, la producción de enzimas (β -lactamasas) es un ejemplo excepcional como mecanismo de resistencia presente de forma natural y que es capaz de generar un impacto negativo en la salud humana²¹.

Se ha considerado que varias moléculas antimicrobianas producidas por bacterias saprófitas logran impedir el crecimiento de otros organismos presentes en ese entorno, un beneficio mutuo en tales entornos ambientales, aunque pocos hallazgos proponen una interacción más complicada. Principalmente, se sugiere que la concentración de sustancias antimicrobianas en el suelo parece mucho más baja y puede no ser capaz de inhibir el crecimiento de bacterias vecinas²².

En segundo lugar, los datos disponibles sugieren que las sustancias antimicrobianas con concentraciones subletales tienen un impacto significativo en la fisiología y la evolución microbiana, y pueden actuar como moléculas de señalización eficaces que pueden inducir la expresión del gen huésped o microbiano²³⁻²⁴.

Pocas especies de bacterias saprofitas producen un tipo vital de antibiótico de amplio espectro conocidos como carbapenems. Varios genes involucrados en la síntesis de carbapenems también pueden desempeñar un papel en la formación de biopelículas o la detección de quórum. Estos hallazgos generan más consultas sobre los impactos inesperados de estos antibióticos. Esta aparición de resistencia no es exclusiva sólo a los antimicrobianos naturales, también ocurre contra los antimicrobianos sintéticos²³.

Los antibióticos destruyen a las bacterias sensibles, pero permiten permanecer a los patógenos resistentes, que luego son capaces de reproducirse y prosperar a través de la selección natural. Aunque se desaconseja el uso excesivo de antibióticos, persiste la prescripción excesiva e injustificada en todo el mundo. Varios estudios han revelado que las indicaciones de tratamiento, la elección del agente y la duración de la terapia con antibióticos son inapropiadas en 30% a 50% de los casos²⁴.

A nivel mundial, los antibióticos son utilizados como promotores del crecimiento en el ganado. Según una estimación, aproximadamente el 80% de los antibióticos se venden en los EE. UU. sólo para su uso como suplementos de crecimiento y para controlar la infección en animales. En otro estudio, se dibujó un mapa global de 228 países que representaba el consumo de antibióticos en el ganado; se estimó que el consumo total de antibióticos fue de 63,151 toneladas en 2010. an Boeckel et al, también proyectaron un aumento del 67% en el consumo de antibióticos que se

duplicaría aproximadamente para el 2030 en Brasil, Rusia, India, China y Sudáfrica, bloque del rápido desarrollo y países altamente poblados del mundo²⁵.

En la actualidad, las etiologías multifacéticas de la resistencia a los antibióticos presentan muchos factores que están en juego. Estos incluyen regulaciones inadecuadas e imprecisiones de su uso, deficiencia de conciencia en las mejores prácticas que dirigen el uso indebido de antibióticos, el uso de antibióticos como un promotor del crecimiento de las aves y el ganado, en lugar de ser utilizados para controlar la infección, y el marketing en línea que hizo que la disponibilidad y el acceso a antibióticos de amplio espectro sea cada vez más común y menos controlada²⁵.

Por otro lado, Imtiaz Fauzia describe que en los países de medianos-bajos ingresos; se ha encontrado un viraje epidemiológico a una mayor frecuencia de enfermedades no transmisibles, particularmente las condiciones cardio-metabólicas y las neoplasias malignas como principales causas de morbilidad; las enfermedades infecciosas por sí mismas, o como complicaciones de las condiciones ya mencionadas, siguen siendo causas importantes de morbilidad y mortalidad en estos países²⁶.

Vignola, et al. (2020) evaluaron el efecto de los “Aceites Esenciales en Bacterias Benéficas, Patógenas y Alterantes de Alimentos”, su objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales como el limón, naranja, mandarina, laurel, eucalipto y burro en diversas cepas bacterianas, *Lactobacillus plantarum* ES147 y ATCC 8014 (bacteria benéfica), *Escherichia coli* ATCC 25922 (bacteria patógena), *Leuconostoc mesenteroides* MS1 (bacteria alterante de alimentos). Se obtuvo el aceite esencial por arrastre con vapor de agua por un tiempo de 90 min máximo. Se preparó 3 cepas bacterianas en sus respectivos agares (Man, Rogosa y Sharpe) a 30°C por un tiempo de 24 h, la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 (Caldo Tripteína soya) a 37°C por un tiempo de 24h, se determinó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de los halos de 10 mm para 3 cepas bacterianas. Se concluye que los aceites esenciales de las cáscaras y hojas secas de limón, eucalipto y burro presentaron un efecto bactericida en las cepas analizadas debido a que no hubo crecimiento, a comparación de los aceites

esenciales de cáscara de naranja y mandarina que presentaron poder antimicrobiano nulo frente a las cepas bacterianas²⁷.

Youcef-Ettoumi et al., (2020), realizaron el estudio “Composición química, actividades antimicrobianas y antioxidantes del aceite esencial de *Citrus sinensis* argelino extraído por hidrodestilación asistida por calentamiento por inducción electromagnética (H-EMIH). Se comparó el H-EMIH con la hidrodestilación convencional (HC) en términos de tiempo de hidrodestilación, rendimiento, composición química y actividades antibacterianas y antioxidantes. Se encontró que la extracción de aceite esencial con H-EMIH dio un rendimiento máximo de 3.77% en 35 min mientras que HC dio 2.72% en 41 min. Los extractos obtenidos por ambas técnicas se analizaron mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas. Las composiciones químicas son relativamente similares; se encontraron limoneno y β -mirceno como compuestos principales. Los resultados de la actividad antioxidante demostraron que el aceite esencial extraído por H-EMIH mostró la mayor capacidad de captación de radicales que el aceite esencial aislado por el proceso HC. Por el contrario, se encontró que el aceite esencial extraído por H-EMIH exhibía un potencial antimicrobiano ligeramente superior al extraído por HC²⁸.

Valdiviezo (2019), evaluó el “Efecto antibacteriano del Aceite esencial de *Citrus sinensis* “naranja” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 comparado con Oxacilina, estudio in vitro” su objetivo fue evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial a diferentes concentraciones 100%, 75%, 50% y 25%, las cepas bacterianas fueron cultivadas en el agar Müller- Hinton. Evaluaron la sensibilidad con el método de Kirby-Bauer, obtuvieron un halo inhibitorio en las diferentes concentraciones preparadas, la dilución al 25% desarrollo un halo de 11.20 mm, la dilución al 50% desarrollo un halo de 12.70mm, la dilución al 75% desarrollo un halo de 13.60mm, y la disolución al 100% desarrolló un halo de 15.50mm. Para la Oxacilina su halo de inhibición fue de 26.50 mm. El ANOVA fue altamente significativo ($p=0.000$), la prueba de Tukey evidenció la homogeneidad de los grupos estudiados y que a mayor concentración del aceite esencial mayor es el efecto antibacteriano, se concluyó que las diferentes concentraciones de AE estudiados no superaron el halo de inhibición de la Oxacilina, por lo que el AE de *Citrus sinensis* tiene menor efecto antibacteriano que la Oxacilina sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213²⁹.

Villa G (2017), realizaron el estudio: “Composición química del aceite esencial de *Citrus paradisi* “Toronja”, actividad antioxidante y determinación de la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*”. El objetivo de la investigación fue determinar la composición química del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad. “toronja”, actividad antioxidante y antibacteriana *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*. El análisis cualitativo de la composición química se realizó por Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas (CG/EM), la actividad antioxidante mediante el uso de los radicales DPPH- ABTS y la actividad antibacteriana mediante difusión en agar. El rendimiento fue de 0,13 mL% v/p, se destacan los siguientes componentes químicos en el aceite esencial: dieciséis monoterpenos, cinco sesquiterpenos, dos ácidos orgánicos, cuatro aldehídos, un éster, cinco hidrocarburos, un fenilpropanoide. El aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad no posee actividad antioxidante frente al patrón estándar de Trolox®. Mostró actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668 en concentraciones de 25, 50 y 100% del aceite esencial, utilizando como control positivo al antibacteriano ciprofloxacino (5ug)³⁰.

Torrenegra-Alarcon, et al (2017) estudiaron la “Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género Citrus”, su objetivo fue evaluar 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 (DO_{620}), 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 antibacteriana³¹.

Ehigbai O y et al., (2016). El objetivo de la investigación fue evaluar la composición fitoquímica y las actividades antioxidantes y antimicrobianas de diferentes concentrados de jugo de cítricos comúnmente disponibles en Nigeria. Los frutos de uva, mandarina, limón y lima fueron cortados y extraídos con un extractor de jugo. La actividad antioxidante fue evaluada mediante el ensayo de DPPH y la actividad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en agar con pozos contra cinco bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.) y tres hongos (*Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Penicillium* spp). La composición fitoquímica de los concentrados de jugos de cítricos reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenoides, saponinas, glucósidos cardíacos y azúcares reductores. En las concentraciones estudiadas, el ácido ascórbico tiene una inhibición significativamente mayor del radical DPPH en comparación con los concentrados de jugo. Las cepas Gram positivas mostraron valores de susceptibilidad más altos que las cepas Gram negativas. *Staphylococcus aureus* registró zonas de inhibición de entre 10 y 20 mm. *Enterococcus faecalis* tenía zonas de inhibición de 8 mm. Se concluye que los zumos de las frutas de uva, mandarina, limón y lima presentan actividad antioxidante y antibacteriana contra las cepas Gram positivas³².

Desde el descubrimiento accidental de la penicilina por Alexander Fleming en el año 1928 se ha revolucionado la práctica de la medicina en todo el mundo. Hoy en día, existen numerosas clases de fármacos antibacterianos. De hecho, actualmente cubren algunos de los problemas contemporáneos que rodean la farmacoterapia para las infecciones bacterianas. Pero, es importante destacar que todos estos problemas contemporáneos están relacionados con el uso efectivo de antibacterianos y que puedan de esta manera contribuir a limitar la amenaza cada vez mayor de resistencia a los antimicrobianos. Datos de modelos recientes han demostrado que la resistencia a los antimicrobianos se está convirtiendo en un problema global que puede provocar la muerte de 10 millones de personas por año para el año 2050³³.

Por lo tanto, el descubrimiento y desarrollo de otras fuentes con propiedades antimicrobianas puede mejorar la supervivencia de las personas que han contraído varias infecciones bacterianas, el aumento de la resistencia ha significado que las opciones de tratamiento tradicionales para ciertas infecciones estén

disminuyendo³³⁻³⁴. Existiendo la necesidad de la búsqueda de antimicrobianos a partir de fuentes naturales, justificándose teóricamente este estudio por cuanto aportaría mayor conocimiento respecto a la actividad antibacteriana a partir del aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”. frente a cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, así mismo presenta una justificación social, por cuanto de comprobarse su efecto terapéutico, se brindaría una alternativa natural que beneficiaría a la población más alejada y de bajos recursos.

En el presente estudio se considerará como objetivo general: Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, in vitro.

La hipótesis de nuestro estudio: El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” presenta actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, in vitro.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ENFOQUE Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Enfoque: Este estudio es de enfoque cuantitativo.

Experimental: Porque se manipulo la variable independiente (aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”) para observar su efecto sobre la variable dependiente (actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027).

Explicativo: Se busca interpretar el por qué ocurre un fenómeno. Nuestro estudio busca relacionar las diferentes concentraciones del aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” y la actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Transversal: Porque los datos fueron medidos por una única vez en un momento dado.

Prospectivo: Porque la ejecución y recolección de los datos se dieron en el presente.

Longitudinal: Porque la variable independiente fue medida en diferentes momentos.

2.2 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

La población, son las plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” fueron recolectadas en horas de la mañana del fundo Casa Blanca, distrito de Vegueta, provincia de Huaura, perteneciente al departamento de Lima.

Del total de la población, se utilizó 4 kg de cáscaras de los frutos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” como muestra.

Se selecciono las plantas que se encuentren en buen estado, visualizando en la parte taxonómica de la planta, teniendo presente la parte morfológica de dicha planta a analizar.

En este estudio, la población microbiológica fueron las bacterias de las cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

El muestreo se realizó de manera aleatoria considerando los criterios de inclusión antes mencionados.

2.3 VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

Variable independiente: Aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”.

Definición conceptual: Mezclas complejas de compuestos producidos por plantas y aislados por destilación por arrastre de vapor.

Definición operacional: Concentración del aceite esencial de las cáscaras de **Citrus sinensis** (L.) Osbeck “naranja”.

Variable dependiente: Actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Definición conceptual: Capacidad de una sustancia para inhibir el crecimiento bacteriano.

Definición operacional: Sensibilidad bacteriana frente al aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” obtenidas por medición del diámetro de los halos de inhibición.

2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La técnica utilizada para la recolección de datos fue la observación, se usaron las fichas de registros, en el cual se registraron los datos obtenidos de las pruebas de solubilidad y de las fases de determinación de la actividad antibacteriana, haciendo uso de un pie de rey o vernier calibrado para registrar los datos de la inhibición de los halos.

2.5. PROCESO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Recolección de la materia prima.

Los frutos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” fueron recolectadas del fundo Casa Blanca, ubicada en el caserío de San Felipe Km. 167 de la panamericana norte, distrito de Vegueta en el departamento de Lima, esta recolección se realizó en horas de la mañana (11:00 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. Se separaron los frutos maltratados de los frutos que se encuentren en buen estado.

Reconocimiento de la materia prima

La materia prima recolectada para la investigación fue llevada al Museo de Historia Natural de la Universidad Mayor de San Marcos para poder identificar la materia prima.

Preparación de la muestra

Los frutos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, se mantuvieron a condiciones climáticas frescas, se realizará una limpieza con abundante agua y se separarán con cuidado las cáscaras de los frutos.

Obtención del aceite esencial

Los 4 Kg de cáscaras de naranjas frescas fueron tratadas en un equipo de destilación por arrastre de vapor de agua. El destilado se separó tomando en cuenta sus propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, utilizando un embudo de separación, las impurezas de agua en el aceite esencial se eliminaron con sulfato de sodio anhidro grado reactivo, y se conservó en un frasco de vidrio de color ámbar, bajo refrigeración a una temperatura de 4°C.

Ensayo de miscibilidad

Una alícuota del aceite esencial se sometió a un ensayo de miscibilidad con los siguientes solventes: agua, metanol, etanol absoluto, n-butanol, pentanol, éter etílico, cloroformo. Los resultados fueron interpretados siguiendo la escala:

- (inmiscible); + (miscible)

Análisis Químico Complementario del aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”

- **Reacción con Molish:** en un tubo de ensayo se agrega 20 gotas del aceite esencial *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, luego se le adicionan 10 gotitas del reactivo Molish, se agita suavemente el tubo de ensayo una vez añadido el reactivo, luego se procede a agregar 2 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) por las paredes del tubo de ensayo, si se observa una línea violeta en la separación de las fases la reacción sería positiva indicando la presencia de azúcares.
- **Reacción con Fehling:** en un tubo de ensayo se agrega 20 gotas del aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, luego se le adicionan 5 gotas del reactivo Fehling (combinación del Fehling A y Fehling B), posteriormente se lleva a baño María, si se observa una coloración de amarillo rojizo la reacción sería positiva.
- **Reacción con $FeCl_3$ 5%:** en un tubo de ensayo se agrega 20 gotas del aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, luego se le adiciona

5 gotas de FeCl₃ al 5%, si se observa una coloración verde azulado la reacción sería positiva.

- **Reacción con Gelatina 1%:** en un tubo de ensayo se agrega 20 gotas del aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, luego se le adicionan de 5 gotas de gelatina, si se observa precipitado de un color blanco la reacción sería positiva.
- **Reacción con Shinoda:** en 2 ml del aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” se le adiciona limaduras de magnesio y posteriormente se le añaden gotas de la solución de ácido clorhídrico (HCl) concentrado, si se observa una coloración roja la reacción sería positiva.
- **Reacción con Liebermann Burchard:** 2 ml del aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” se disuelve con un 1ml de cloroformo. Luego adiciona 1ml de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo se dejan correr 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio de coloración:
 1. Rosado- azul, muy rápido.
 2. Verde intenso visible, aunque rápido.
 3. Verde oscuro- negro, final de la reacción.
- **Reacción con Baljet:** Se adiciona 4 gotas del reactivo a 0.5ml del aceite esencial reconstituido en 1 mL de etanol, una coloración naranja o roja es positivo para esta prueba.
- **Reacción con Dragendorff:** en un tubo de ensayo se agregan 20 gotas del aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, luego se le adicionan 5 gotas de HCl y finalmente se le añaden 5 gotas del reactivo Dragendorff, si se observa un precipitado de color anaranjado la reacción sería positiva.

- **Reacción con Mayer:** en un tubo de ensayo se agregan 20 gotas del aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck "naranja", luego se le adicionan 3 gotas del reactivo de Mayer, si se observa un precipitado de color blanco lechoso la reacción sería positiva.
- **Reacción con Borntranger:** A una alícuota del aceite esencial se le agrega 1ml de cloroformo. Se adiciona 1ml de NaOH, KOH o NH₄OH a 5% en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado a rojo, el ensayo se considera positivo (+), coloración rosada (++) , coloración roja (+++).
- **Reacción con Ninhidrina:** en un tubo de ensayo se agregan 20 gotas del aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck "naranja", luego se le adicionan 3 gotas del reactivo Ninhidrina, se lleva a calor por unos 5 minutos, si se observa un color violáceo la reacción sería positiva.

Ensayo de densidad relativa

Se evaluó pesando cuidadosamente el picnómetro, picnómetro con agua destilada y con la muestra. Donde:

$$D = (P.MP - P) \div (P.agua - P)$$

Donde:

D: Densidad relativa.

P. MP : Peso del picnómetro con muestra (g).

P. agua: Peso del picnómetro con agua destilada (g).

P : Peso del picnómetro vacío (g).

Rendimiento del aceite esencial (RAE)

Para la determinación del rendimiento se realizó con el volumen de destilado del aceite esencial obtenido en la probeta florentino mediante el método gravimétrico-volumétrico.

$$\%RAE = \text{Vol. AE(mL)} / P_{\text{muestra}} \text{ (g)} \times 100$$

Donde:

Vol. AE: Volumen del aceite esencial obtenido en mililitros.

P_{muestra}: Peso de la muestra a destilar en gramos.

Prueba antibacteriana

Método de Difusión en agar

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido y se evidencia por la formación de halos claros alrededor de las colonias.

Microorganismo:

- *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Muestra:

Aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”

Preparación del inóculo

Se procedió a suspender al microorganismo en solución salina 0,85% estéril y se ajusta la turbidez al equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland.

Preparación e inoculación de las placas

El medio agar Mc Conkey previamente reconstituido, esterilizado, enfriado y mantenido a 45 °C, se procede a inocular con 1 mL de suspensión del inóculo (1 x10⁶ ufc/mL) por cada 100 mL de medio de cultivo, homogenizado y distribuido en placas Petri de vidrio estéril de 90 mm. de diámetro. Se dejó solidificar y se rotuló con el nombre del microorganismo. Finalmente se realizaron pozos con la

ayuda de un sacabocado de acero de 11 mm. de diámetro externo, en cada placa se hizo 4 pozos equidistantes.

Inoculación e incubación de la muestra

Se procedió a colocar 20 μ L del aceite esencial en las concentraciones señaladas anteriormente en los pozos, se deja reposar por 60 minutos a temperatura ambiente y se lleva a incubación a 37°C por 24 horas.

Controles

Para el ensayo se usó como control positivo (sulfato de neomicina al 0.2mg/mL) y control negativo (dimetilsulfoxido).

Lectura e interpretación de los resultados

Se observó las zonas claras de inhibición del crecimiento (halos) y se mide los diámetros en milímetros (mm). Se considero que tiene una actividad antibacteriana significativa a un halo de inhibición mayor a 18mm.

2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La información que se recolectó se digitó en el programa Excel y Word, en su versión reciente, donde se trabajó la media y desviación estándar como medidas de tendencia central para comparar los distintos tratamientos.

2.7. ASPECTOS ÉTICOS

No se registró en el presente proyecto.

III. RESULTADOS

3.1 Prueba de miscibilidad

Tabla 1. Ensayo de miscibilidad del aceite esencial *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”

Aceite esencial 0.1 mL	SOLVENTES	RESULTADO
Tubo 1	Etanol (1ml)	+
Tubo 2	Metanol (1ml)	-
Tubo 3	Cloroformo (1ml)	+
Tubo 4	n-hexano (1ml)	+
Tubo 5	Éter de petróleo (1ml)	+
Tubo 6	Agua destilada (5ml)	-

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

- (-) Inmiscible
- (+) miscible

En la tabla 1, se puede apreciar los resultados de la prueba de miscibilidad del aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, mostrando miscibilidad en los solventes tales como etanol, cloroformo, n-hexano y éter de petróleo.

3.2. Análisis Químico Complementario

Tabla 2. Análisis Químico del aceite esencial

CONSTITUYENTES QUÍMICOS	ENSAYO	REACCIÓN
Carbohidratos	Rvo. Molish	-
Azúcares reductores	Rvo. Fehling	-
Compuestos fenólicos	Rvo. FeCl ₃ 5%	-
Taninos catéquicos	Rvo. Gelatina 1%	-
Flavonoides	Rvo. Shinoda	-
Esteroides y triterpenoides	Rvo. Liebermann Burchard	++
Cardenólidos	Rvo. Baljet	-
Alcaloides	Rvo. Dragendorff	-
	Rvo. Mayer	-
Antraquinonas	Rvo. Borntranger	-
Proteínas	Rvo. Ninhidrina	-

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

- (-) Ausencia
- (+) Leve
- (++) Moderado
- (+++) Abundante

En la tabla 2, se observa los resultados del análisis químico que se practicó al aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, la determinación se realizó mediante pruebas cualitativas de coloración y precipitación con la finalidad de identificar los metabolitos secundarios con presunta actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Se evidencia la presencia moderada de esteroides y triterpenoides, obtenidos con el ensayo de Liebermann Burchard.

3.3 Determinación de la densidad relativa del aceite esencial

Tabla 3. Densidad relativa del aceite esencial

Densidad relativa (g/mL)	Promedio
0,84	0,826 ± 0,011*
0.82	
0,82	

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 3, se puede apreciar la densidad relativa del aceite esencial de $0,826 \pm 0,011$ g/mL. *Desviación estándar.

3.4. Rendimiento AE

Tabla 4. Redimiendo del aceite esencial *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”

Muestra	Cantidad de muestra fresca (Kg)	Cantidad de aceite esencial(mL)	Rendimiento (%) v/p
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja”	4	18	0,45

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 4, se puede apreciar la cantidad de 18 mL de aceite esencial extraído de 4 kg de cáscara fresca de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, obtenido mediante hidrodestilación, con un rendimiento equivalente al 0,45%.

3.5 Actividad antibacteriana

Para la determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” frente a cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, se trabajaron concentraciones de

25%, 50%, 75% y 100%, control positivo Neomicina sulfato 0.2mg/ml y como blanco Dimetil sulfóxido.

Tabla 5. Resultado promedio de las mediciones de los halos de inhibición (mm) del aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”

Bacteria	Diámetro de Inhibición en milímetros (mm)					
	Control*	Blanco**	25%	50%	75%	100%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *** ATCC 9027	15.71	6	6	6	6	6
	15.47	6	6	6	6	6
	15.75	6	6	6	6	6
	15.58	6	6	6	6	6
Promedio	15.63	6	6	6	6	6
Desviación estándar	0.13	0	0	0	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> *** ATCC 14028	16.26	6	6	6	6	6
	16.32	6	6	6	6	6
	16.21	6	6	6	6	6
	16.29	6	6	6	6	6
Promedio	16.27	6	6	6	6	6
Desviación estándar	0.047	0	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

- (*) Neomicina sulfato 0.2mg/mL
- (**) Dimetil sulfóxido
- (***) Concentración del inoculo: 1×10^8 UFC/MI

Escala de Duraffourd y Lapraz

(-) Nula: Diámetro (< 8 mm);

(+) Sensible bajo: Diámetro (8 – 14 mm);

Medio (muy sensible): Diámetro (14 - 20 mm) y

Sumamente sensible: Diámetro (> 20 mm)

En la tabla 5, se observan los resultados promedios de los halos de inhibición en milímetros (mm) , el ensayo se realizó el 11 de noviembre del 2020, la medición del halo es indicativo del efecto antibacteriano que presenta el aceite esencial de las

cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” frente a las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14028 y *Salmonella typhimurium* ATCC 9027.

Según la escala interpretativa detallada anteriormente, las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14028 y *Salmonella typhimurium* ATCC 9027, para todas las concentraciones, así como para el blanco presenta valores menores que no superan los 6 mm, es decir no se encuentra actividad antibacteriana, según la escala se considera que el aceite esencial presenta una actividad antibacteriana nula. El control positivo (Neomicina sulfato) presentó un valor promedio de 15.63mm y 16.27mm para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14028 y *Salmonella typhimurium* ATCC 9027, respectivamente.

3.6. Contrastación de Hipótesis

3.6.1. Contrastación de Hipótesis General

H0: El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, no presenta actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, in vitro.

H1: El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” presenta actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, in vitro.

En la tabla 5 se observa que el aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” frente a la cepa de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, no presentó actividad antibacteriana, ya que el control presenta una media de 6.00 mm, del mismo modo, los grupos conformados por aceite esencial al 100, 75, 50 y 25% presenta un halo de inhibición igual al del control, dichos valores según la escala de Duraffourd y Lapraz presentan una sensibilidad nula, evidenciando la ausencia de actividad. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula (H0) y se rechaza la hipótesis alterna (H1).

Conclusión: El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, no posee actividad antibacteriana frente a las cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

3.6.2 Contrastación de Hipótesis específicas

HIPOTESIS ESPECIFICA 1

- **H0:** El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, no posee metabolitos secundarios.
- **H1:** El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” posee metabolitos secundarios.

Para contrastar la segunda hipótesis específica, se realizó el análisis químico del aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, mediante ensayos de coloración y precipitación, dependiendo de los grupos químicos presentes en la muestra vegetal, se identificó los metabolitos secundarios con actividad antibacteriana, en la Tabla N° 2, se evidencia una reacción positiva moderada para la presencia de esteroides y triterpenoides.

La presencia de este grupo de metabolitos secundarios no estaría relacionada con la actividad antibacteriana del aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula (H0) y se rechaza la hipótesis alterna (H1).

Conclusión: El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, no posee metabolitos secundarios con actividad antibacteriana.

HIPOTESIS ESPECIFICA 2

- **H0:** A mayor concentración del aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, no posee mejor actividad antibacteriana frente a las cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
- **H1:** A mayor concentración del aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, posee mejor actividad antibacteriana frente a las cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Según la tabla 5, donde se presentan los diámetros de los halos de inhibición, se evidencia que las diferentes concentraciones del aceite esencial no presentan actividad frente a las cepas de *Salmonella*

typhimurium ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula (H0), y se rechaza la hipótesis alterna (H1).

En conclusión: A mayor concentración del aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, no posee mejor actividad antibacteriana frente a las cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

HIPOTESIS ESPECIFICA 3

- **H0:** El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, no presenta mejor actividad comparado con el control positivo, evidenciando una mayor sensibilidad de las cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
- **H1:** El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, presenta mejor actividad comparado con el control positivo, evidenciando una mayor sensibilidad de las cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Según la tabla 5, donde se aprecian los halos de inhibición, el control positivo muestra un halo de inhibición de 15.63mm y 16.27mm para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 respectivamente, mientras que el aceite esencial muestra un halo de inhibición constante de 6 mm, lo cual demuestra la ausencia de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”. Por lo tanto, se aprueba la hipótesis nula (H0) y se rechaza la hipótesis alterna (H1).

Conclusión: El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, no presentó mejor actividad antibacteriana comparado con el control positivo, evidenciando una mayor sensibilidad de las cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

IV. DISCUSIÓN

4.1 Discusión de resultados

En nuestra investigación se evidenció un rendimiento de 0,45% p/v mediante el método de hidrodestilación a partir de 4 kg de cáscara de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, valor similar al reportado por Juárez³⁷ con un rendimiento de 0,4% para el aceite esencial de *Citrus sinensis* utilizando la misma metodología de extracción. Villa³⁰ en el año 2017 reportó un rendimiento de 0,13 % p/v para *Citrus paradisi*, esta disminución podría deberse a la diferencia respecto a la zona de cultivo del material vegetal, considerando importante establecer los diferentes periodos de recolección, los cuales deben estar referidos en los criterios de selección de la muestra, adicionalmente el método que utilizó Villa³⁰ para la obtención del aceite fue por destilación por arrastre de vapor de agua. El rendimiento de los aceites esenciales es dependiente del método de extracción utilizado para su obtención, por ejemplo, existen diferencias evaluadas en la obtención del aceite esencial de *Citrus sinensis* y *Citrus paradisi*, entre la hidrodestilación convencional y la hidrodestilación asistida por microondas, mostrando mayores rendimientos al tiempo de la hidrodestilación asistida por microondas con un incremento aproximada del 50% en el rendimiento³⁸.

Citrus sinensis (L.) Osbeck “naranja”, es una especie frutal ampliamente distribuida en el mundo, debido a su adaptación al territorio peruano puede encontrarse a lo largo de las regiones de la costa, sierra y selva, dicha adaptación brinda diversas características como el tamaño, color y contenido de metabolitos, esto dependiente de la zona de cultivo³⁵. El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, se obtuvo mediante hidrodestilación, el material fresco fue procedente del departamento de Lima, distrito Vegueta, provincia de Huaura. El método ejecutado en nuestra investigación es uno de los más utilizado para la obtención de aceites esenciales debido a su bajo costo de implementación, al igual que la destilación por arrastre a vapor de agua, entre las desventajas de dicho método, investigadores reportan la degradación de componentes termolábiles como la degradación de beta caroteno en beta ionona, además de la formación de linalol y geraniol mediante la hidrolisis de compuestos glucósidos⁵⁵⁻⁵⁶, adicionalmente de la pérdida de componentes polares y polaridad media

denominados hidrolatos que se encuentran presentes en la fracción acuosa del destilado total, siendo equivalente a un total mayor del 90%.³⁶⁻⁵³⁻⁵⁴

El aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck "naranja", presentó una reacción positiva con el reactivo de Liebermann Buchard indicando la presencia de esteroides y triterpenoides, este tipo de ensayo no es ideal al momento de realizar la identificación de metabolitos secundarios sino, las pruebas analíticas como la cromatografía de gases y la espectrometría de masas que se utilizan en conjunto para facilitar su separación y reconocimiento de los metabolitos secundarios volátiles presentes en los aceites esenciales⁴³. Diversos estudios evidencian que el componente principal en el aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck "naranja" es el d-limoneno o 1-Metil-4-(1-metiletenil)-ciclohexeno, este compuesto se le clasifica como un terpenoide con un peso molecular de 136,23 g/mol siendo poco soluble en agua⁴⁴. La presencia de este metabolito es característico en las especies vegetales del género *Citrus*, pero la cantidad del metabolito dependerá de la parte vegetal analizada, por ejemplo, en el fruto es el componente mayoritario a una concentración del 81.5% mientras que en las hojas está presente al 16.67 % y en las ramas verdes al 71.57%.⁴⁴⁻⁴⁵

El segundo metabolito presente en mayor cantidad es el beta-mirceno a una concentración del 2,95%, seguido del aldehído octanal al 1,95 %, seguido de sus componentes minoritarios⁴⁴⁻⁴⁷. Otra investigación detalla la presencia del d-limoneno como componente mayoritario en muestras como: una esencia de fase oleosa de naranja al 80,61%, aceite esencial de cáscara de naranja 81,18%, naranja brasileña 79,38 %, fase oleosa de lima 47,46% y aceite de cáscara de naranja extraído en cinco repeticiones 82,07%.⁴⁶

Al evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck "naranja" frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, se evidenció un halo de inhibición de 6 mm, valor idéntico al halo de inhibición del control (dimetilsulfoxido), esto evidencia una actividad nula. Una investigación que evaluó la actividad del aceite de *C. sinensis* sin terpenos obtenidos mediante prensado al frío las cuales fueron disueltas en etanol y dimetilsulfóxido (DMSO) mostraron una concentración mínima inhibitoria para *Listeria monocytogenes* al 0,3% en etanol y 0,25% v/v en DMSO, y

para *Salmonella typhimurium* al 1% v/v en los dos solventes, etanol y DMSO, respectivamente⁴⁸. La actividad presente en la anterior investigación se debe a la presencia de los componentes minoritarios, excluyendo al d-limoneno al ser un terpeno el cual no se encuentra presente en el aceite de naranja prensada al frío, estas actividades son similares a lo detallado por Delaquis⁴⁹, siendo una explicación de la nula actividad que se presentó en nuestra investigación. Adicionalmente, se tiene un reporte indicando que los aceites esenciales, especialmente los aceites esenciales con mezclas complejas de octanol, decanol, ocatanal, decanal y carvona, inhiben fuertemente el crecimiento de bacterias Gram positivas y algunas levaduras, pero tenían poco efecto sobre *S. typhimurium*⁴⁸⁻⁴⁹.

Existen reportes que describen que los componentes como d-limoneno, mircenol y γ -terpineno casi no tenían actividad antibacteriana contra algunas cepas y estudios aislados describen que el α -pineno es sensible frente a las cepas de *S. paratyphi*, *B. subtilis*, *C. albicans* y *A. flavus*, pero resistentes a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. El linalol y el β -pineno, especialmente el linalol, reportan actividades antibacterianas más fuertes que otros componentes, investigadores reportan que el linalol inhibe el crecimiento de *A. flavus*. Fisher et al³⁹ en el año 2006 informaron que el linalol, tenía capacidad antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Campylobacter jejuni*. Recientemente, también se demostró que el linalol inhibía el crecimiento de *C. jejuni* y *Campylobacter coli* en toda la placa mediante método de difusión en agar⁴⁰. El linalol ha sido generalmente reconocido como antibacteriano seguro, por lo que tiene un gran potencial para ser ampliamente utilizado como conservante en la industria alimentaria⁴¹, pero es importante destacar que los estudios de componentes aislados difieren de los de los aceites esenciales, debido a que un aceite esencial es una mezcla compleja de diferentes metabolitos y a diferentes concentraciones, por lo cual podría existir un antagonismo tanto entre sus componentes mayoritarios como minoritarios.

En nuestra investigación se demostró que el aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck "naranja" no presentó actividad antibacteriana en ninguna de las 4 concentraciones analizadas, ya que no hubo crecimiento del halo de inhibición frente a las cepas, sin embargo se pudo observar resultados positivos para nuestro control positivo (Neomicina Sulfato 0.2g/ml), presentando un valor

promedio de 15.63 mm y 16.27mm para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 respectivamente, los resultados fueron parecidos a los detallados por Srinivasan⁵⁷ en el año 2009, quien reporta un halo de inhibición de *Salmonella typhimurium* 29 mm y *Pseudomonas aeruginosa* 24 mm frente al mismo estándar. Mientras que Selman⁵⁸ reporta concentraciones inhibitorias de crecimiento para *Salmonella spp* de 0.1 a 0.625 ug/mL de sulfato de neomicina y para *Pseudomonas aeruginosa* de 12.5 a 25 ug/mL de sulfato de neomicina. Concluyendo así que el control positivo (neomicina sulfato 0.2mg/ml) si presentó actividad antibacteriana, a comparación de las demás concentraciones del aceite esencial que no poseen actividad antibacteriana.

La actividad del sulfato de neomicina es por su acción bactericida al inhibir la síntesis de proteínas bacterianas mediante la unión irreversible a la subunidad ribosómica 30 S de bacterias susceptibles. La neomicina se transporta activamente al interior de la célula bacteriana donde se une a los receptores presentes en la subunidad ribosómica 30S⁴².

4.2 Conclusiones

Los estudios realizados en el presente trabajo nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, mostró ausencia (-) para los metabolitos como los alcaloides, flavonoides y taninos, pero indican presencia (+) de esteroides y triterpenoides, los cuales no estarían relacionados con la actividad antibacteriana.
- El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” no presentó actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *in vitro*, en ninguna de sus concentraciones.
- El aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, no presentó mejor actividad antibacteriana comparado con el control positivo, frente a las cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 *In vitro*.

4.3 Recomendaciones

- Se sugiere realizar más investigaciones sobre los aceites esenciales de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja” por métodos más específicos como los de Cromatografía de Gases acoplado a un detector de espectrometría de masas, para así poder tener mayor información respecto a los metabolitos secundarios que pudieran estar presentes en el aceite esencial, esto a la vez sería de ayuda para la realización de otras investigaciones apuntando a otras propiedades diferentes a las antibacterianas.
- Realizar diferentes métodos de extracción del aceite esencial, los cuales pudieran permitir un mejor rendimiento, pureza y mayor conservación del aceite esencial, de esta manera mejorar el reconocimiento de los metabolitos secundarios, los cuales pudieron haberse perdido a través del método empleado.
- Se recomienda evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”, frente a otras cepas microbiológicas, para así poder identificar algún microorganismo que resultara sensible frente a las propiedades de los AEC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chang HH, Cohen T, Grad YH, Hanage WP, O'Brien TF, Lipsitch M: Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 2015, 79:101-116. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25652543/> [Consultado el 19 de diciembre del 2020].
2. Sociedad Española de Medicina Preventiva Salud Pública e Higiene[Internet] citado 2012. Disponible en: <https://www.sempsph.com/es/noticias/salud-publica/en-el-ano-2050-habra-mas-muertes-relacionadas-con-superbacterias-resistentes-que-por-cancer.html?fbclid=IwAR0yPYxBp-blb4eEYvAPiwkS-H3I0jilBgbDmc6mwWwlnDQkbXM2NFKidfw> [Consultado el 19 de Diciembre del 2020].
3. Lazar V, Martins A, Spohn R, Daruka L, Grezal G, Fekete G, Szamel M, Jangir PK, Kintses B, Csorgo B. Antibiotic resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides. *Rev:National Library of Medicine*[Internet]. 2018. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29795541/> [Consultado el 19 de diciembre del 2020].
4. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM: Mechanisms of increased resistance to chlorhexidine and cross-resistance to colistin following exposure of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to chlorhexidine. *Antimicrob Agents Chemother* 2017, 61:01162-16[Consultado el 19 de Diciembre del 2020].
5. Fleitas O, Franco OL. Induced bacterial cross-resistance toward host antimicrobial peptides: a worrying phenomenon. *Front Microbiol* 2016, 7:381. [Consultado el 19 de Diciembre del 2020].
6. Buckheit RW, Lunsford RD: In vitro performance and analysis of combination anti-infective evaluations. In *Antimicrobial Drug Resistance*. Edited by Mayers D, Sobel J, Oullette M, Kaye K, Marchaim D. Springer; 2009:1135-1149. [Consultado el 19 de Diciembre del 2020].
7. Donsi F, Wang Y y Huang Q. Estabilidad de congelación-descongelación de lecitina y nanoemulsiones a base de almidón

- modificado. *Hidrocoloides alimentarios*, 2011;25 (5):1327-1336. [Consultado el 05 de Enero del 2021].
8. Muller, PS . *Microencapsulação do óleo essencial de laranja* (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2011. [Consultado el 05 de Enero del 2021].
 9. Chaudhari S, Ruknuddin G, Prajapati P. Ethno medicinal values of Citrus genus: A review. *Medical Journal of Dr DY Patil University*. 2016;9(5):560. [Consultado el 05 de Enero del 2021].
 10. Al-Ashaal, H.A.; El-Sheltawy, S.T. Antioxidant capacity of hesperidin from citrus peel using electron spin resonance and cytotoxic activity against human carcinoma cell lines. *Pharm. Biol.* **2011**, *49*, 276–282. [Consultado el 05 de Enero del 2021].
 11. Benavente-García O Castillo J. Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(15):6185-6205. [Consultado el 05 de Enero del 2021].
 12. Suntar I, Khan H, Patel S, Celano R, Rastrelli L. An Overview on Citrus aurantium L.: Its Functions as Food Ingredient and Therapeutic Agent. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;2018(1):1-12. [Consultado el 11 de Enero del 2021].
 13. Settanni L, Palazzolo E, Guarrasi V, Aleo A, Mammina C, Moschetti G. Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food Control*. 2012;26(2):326-330. [Consultado el 11 de Enero del 2021].
 14. Li S, Lo C, Dushenkov S, Ho C. Polymethoxyflavones: Chemistry, Biological Activity, and Occurrence in Orange Peel. *ACS Symposium Series*. 2008;191-210. [Consultado el 11 de Enero del 2021].
 15. Hou, H. S., Bonku, E. M., Zhai, R., Zeng, R., Hou, Y. L., Yang, Z. H., & Quan, C. Extraction of essential oil from *Citrus reticulata* Blanco peel and its antibacterial activity against *Cutibacterium acnes* (formerly *Propionibacterium acnes*). *Heliyon*, 2019; 5(12): 29-47. [Consultado el 11 de Enero del 2021].

16. Apraj V, Pandita N. Evaluation of skin anti-aging potential of *Citrus reticulata* blanco peel. *Pharmacognosy Research*. 2016;8(3):160. [Consultado el 15 de Enero del 2021].
17. Shetty S, Mahin-Syed-Ismail P, Varghese S, Thomas-George B, Kandathil-Thajuraj P, Baby D. Antimicrobial effects of *Citrus sinensis* peel extracts against dental caries bacteria: An in vitro study. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 2016;8(1):70-77. [Consultado el 15 de Enero del 2021].
18. Sridharan B, Michael S, Arya R, Mohana Roopan S, Ganesh R, Viswanathan P. Beneficial effect of *Citrus limon* peel aqueous methanol extract on experimentally induced urolithic rats. *Pharmaceutical Biology*. 2015;54(5):759-769. [Consultado el 15 de Enero del 2021].
19. Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2016;387(10014):176–187. [Consultado el 15 de Enero del 2021].
20. Andersson DI, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(7):465–478. [Consultado el 17 de Enero del 2021].
21. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol*. 2014;4(1):422. [Consultado el 17 de Enero del 2021].
22. Aslam B, Wang W, Arshad M, Khurshid M, Muzammil S, Rasool M. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*. 2018; 11(1):1645-1658. [Consultado el 17 de Enero del 2021].
23. Read AF, Woods RJ. Antibiotic resistance management. *Evol Med Public Health*. 2014;147(1). [Consultado el 21 de Enero del 2021].
24. Wright GD. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Can J Microbiol*. 2014;60(3):147–154. [Consultado el 21 de Enero del 2021].
25. Khurshid M, Rasool MH, Ashfaq UA, Aslam B, Waseem M. Emergence of harboring carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Pakistan. *Future Microbiol*. 2017; 12:1261–1269. [Consultado el 21 de Enero del 2021].

26. Imtiaz F. Infectious diseases burden and surveillance: an epidemiological survey. *Epidemiol.* 2014;4(2):1000-116. [Consultado el 21 de Enero del 2021].
27. María B. Vignola, et al. Actividad Antimicrobiana de Diversos Aceites esenciales en bacterias benéficas, patógenas y alterantes de alimentos, *Revista Tecnológica y Ciencia* 2020;37; 92-100. Disponible en: <http://rtyc.utn.edu.ar/index.php/rtyc/article/view/566/477> [Consultado el 03 de Febrero del 2021].
28. Youcef-Ettoumi K, Zouambia Y, Moulai-Mostefa N. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Algerian *Citrus sinensis* essential oil extracted by hydrodistillation assisted by electromagnetic induction heating. *Journal of Food Science and Technology.* 2020;1(1):1-7. [Consultado el 03 de Febrero del 2021].
29. Mayra Paola Valdiviezo Flores. Efecto Antibacteriano del aceite esencial *Citrus sinensis* “naranja” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC29213 comparado con Oxacilina, estudio in vitro [Tesis]. Trujillo: Universidad Cesar Vallejo;2019. [Consultado el 03 de febrero del 2021].
30. Villa G. Composición química del aceite esencial de *Citrus paradisi* “Toronja”, actividad antioxidante y determinación de la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* [Tesis Maestría]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2017. [Consultado el 03 de febrero del 2021].
31. M.E. Torrenegra-Alarcón, N.P. Pájaro, G. León-Méndez, Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*, *Rev.Colomb.Cienc.Quim.Farm.*,46 (2),160-175 (2017). Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v46n2/0034-7418-rccqf-46-02-00160.pdf> [consultado el 03 de Febrero del 2021].
32. Ehigbai I, Ehimwenma S, Omoregie Faith y Kelly Oriakhi. Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates .2016; 12(1):01-07. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4708628/pdf/FSN3-4-103.pdf>[Consultado el 03 de Febrero del 2021].

33. Gaynes R. The discovery of penicillin new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerg. Infect. Dis.* 2017;23(1): 849–853. [Consultado el 05 de Febrero del 2021].
34. O'Neill J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally—Final Report and Recommendations. London, The Review on Antimicrobial Resistance, 2016. [Consultado el 05 de Febrero del 2021].
35. Lihua. EFECTO DE LA SACAROSA Y COTILEDONES SOBRE EL PRENDIMIENTO DE MICROINJERTOS in vitro DE NARANJA Y LIMÓN (Citrus sp.) Tesis para obtener el título profesional de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias. Lima; 2018.
Disponible en:
<http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3192/F02-L45-T.pdf?sequence=4&isAllowed=y#:~:text=Las%20primeras%20plantaciones%20regulares%20de,el%20Per%C3%BA%20por%20los%20espa%C3%B1oles.> [Consultado el 05 de Febrero del 2021].
36. Masango Phineas. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production.* 2005;13(1):833-839. [Consultado el 05 de Febrero del 2021].
37. Juárez J, Castro A, Jaúregui J, Lizano J, Carhuapoma M, y col. Composición química, actividad antibacteriana de aceite esencial de Citrus sinensis L.. *Ciencia e Investigación* 2010; 13(1): 9-13 [Consultado el 07 de Febrero del 2021].
38. Torrenegra A, et al. Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género Citrus. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2017; 46(2): 160-175. 13 [Consultado el 07 de Febrero del 2021].
39. Fisher, K.; Phillips, C. A., The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology* 2006;101 (6): 1232-1240. 13 [Consultado el 07 de Febrero del 2021].

40. Duarte, A.; Luís, Â.; Oleastro, M.; Domingues, F. C., Antioxidant properties of coriander essential 548 oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. *Food Control*. 2016; 61(1):115-122 13 [Consultado el 08 de Febrero del 2021]
41. Jia-jing Guo, Zhi-peng Gao, Jin-lan Xia, Mark A. Ritenour, Gao-yang Li, Yang Shan. Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of citrus essential oils from the main cultivated varieties in China. *Food Science and Technolog.* [Consultado el 08 de Febrero del 2021]
42. Lovina Goyal, et al. Evaluation of Chemical Composition and Antioxidant Potencial of Essential Oil from *Citrus reticulata* Fruit Peels. *Rev. Advances in Research*. 15(2): 1-9, 2018. [consultado el 22 de Febrero del 2021].
43. Al-Rubaye A, Hameed I, Kadhim M. A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants. *INTERNATIONAL JOURNAL OF TOXICOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL RESEARCH*. 2017;9(01):81-85. [consultado el 22 de Febrero del 2021].
44. Barros Gomes P, Da Costa Leite Júnior J, Andrade de Sousa D, Oliveira Everton G, Batista Reis J, Costa Louzeiro H et al. Estudo da composição química, toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 2020;49(1):1-6. . [consultado el 22 de Febrero del 2021].
45. Okla M, Alamri S, Salem M, Ali H, Behiry S, Nasser R et al. Yield, Phytochemical Constituents, and Antibacterial Activity of Essential Oils from the Leaves/Twigs, Branches, Branch Wood, and Branch Bark of Sour Orange (*Citrus aurantium* L.). *Processes*. 2019;7(6):363. . [consultado el 22 de Febrero del 2021].
46. Ambrosio C, Ikeda N, Miano A, Saldaña E, Moreno A, Stashenko E et al. Unraveling the selective antibacterial activity and chemical composition of citrus essential oils. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-12. [consultado el 23 de Febrero del 2021].

47. O'Bryan C, Crandall P, Chalova V, Ricke S. Orange Essential Oils Antimicrobial Activities against *Salmonella* spp. *Journal of Food Science*. 2008;73(6):264-267. [consultado el 23 de Febrero del 2021].
48. Chalova V, Crandall P, Ricke S. Microbial inhibitory and radical scavenging activities of cold-pressed terpeneless Valencia orange (*Citrus sinensis*) oil in different dispersing agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010;90(5):870-876. [consultado el 23 de Febrero del 2021].
49. Delaquis P. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 2002;74(1-2):101-109. [consultado el 23 de Febrero del 2021].
50. Fotsing Yannick Stephane F, Kezetas Jean Jules B. Terpenoids as Important Bioactive Constituents of Essential Oils. *Essential Oils - Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications*. 2020;1(1):1-10. [consultado el 23 de Febrero del 2021].
51. Chouhan S, Sharma K. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils— Present Status and Future Perspectives. *Medicines*. 2017;4(3):58.
52. Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*. 2016;3(4):25. [consultado el 25 de Febrero del 2021].
53. Hamedi A, Moheimani S, Sakhteman A, Etemadfard H, Moein M. An Overview on Indications and Chemical Composition of Aromatic Waters (Hydrosols) as Functional Beverages in Persian Nutrition Culture and Folk Medicine for Hyperlipidemia and Cardiovascular Conditions. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2017;22(4):544-561. [consultado el 25 de Febrero del 2021].
54. Smigielski K, Prusinowska R, Stobiecka A, Kunicka-Styczyńska A, Gruska R. Biological Properties and Chemical Composition of Essential Oils from Flowers and Aerial Parts of Lavender (*Lavandula angustifolia*). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2018;21(5):1303-1314. . [consultado el 25 de Febrero del 2021].

55. Qin P, Ma T, Wu L, Shan F, Ren G. Identification of Tartary Buckwheat Tea Aroma Compounds with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Food Science*. 2011;76(6):401-407. . [consultado el 03 de Marzo del 2021].
56. Gao X, Lv S, Wu Y, Li J, Zhang W, Meng W et al. Volatile components of essential oils extracted from Pu-erh ripe tea by different extraction methods. *International Journal of Food Properties*. 2017;20(1):240-253. . [consultado el 03 de Marzo del 2021].
57. Srinivasan Durairaj. In vitro Antibacterial Activity and Stability of Garlic Extract at Different pH and Temperature. *Electronic Journal of Biology*, 2009; 5(1): 5-10. . [consultado el 03 de Marzo del 2021].
58. Selman A. Waksman . NEOMYCIN—PRODUCTION AND ANTIBIOTIC PROPERTIES. *J Clin Invest*. 1949;28(5):934-939. . [consultado el 08 de Marzo del 2021].

ANEXOS

Anexo A. Operacionalización de las variables

Ti po	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores
Independiente	Aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck "naranja".	Mezclas complejas de compuestos producidos por plantas y aislados por destilación por arrastre de vapor.	Concentración del aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck "naranja".	Concentración del aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck "naranja".	100, 75, 50 y 25%
Dependiente	Actividad antibacteriana frente a <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Capacidad de una sustancia para inhibir el crecimiento bacteriano.	Sensibilidad bacteriana frente al aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck "naranja" obtenidas por medición del diámetro de los halos de inhibición	Bacteriológico	Medición de los halos de inhibición (mm.)

ANEXO B. INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

ANÁLISIS QUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL

CONSTITUYENTES QUÍMICOS	ENSAYO	REACCIÓN
Carbohidratos	Rvo. Molish	
Azúcares reductores	Rvo. Fehling	
Compuestos fenólicos	Rvo. FeCl ₃ 5%	
Taninos catéquicos	Rvo. Gelatina 1%	
Flavonoides	Rvo. Shinoda	
Esteroides y triterpenoides	Rvo. Liebermann Burchard	
Cardenólidos	Rvo. Baljet	
Alcaloides	Rvo. Dragendorff	
	Rvo. Mayer	
Antraquinonas	Rvo. Borntranger	

DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL

CEPAS	<i>Escherichia</i>			<i>Staphylococcus</i>				
Concentración del aceite esencial (%)	Halos de inhibición (mm)							
	N			X	N			X
	1	2	3		1	2	3	
100								
75								
50								
25								

ANEXO C. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

CONSTANCIA N° 373-USM-2019

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

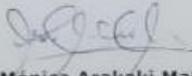
La muestra vegetal (fruto), recibida de **Fredy Edgard Bias Espinoza**, estudiante de la Universidad Alas Peruanas; ha sido estudiada y clasificada como: ***Citrus sinensis* (L.) Osbeck**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA
CLASE: MAGNOLIOPSIDA
SUB-CLASE: ROSIDAE
ORDEN: SAPINDALES
FAMILIA: RUTACEAE
GENERO: Citrus
ESPECIE: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Nombre vulgar: "naranja".
Determinado por: Blgo. Severo Baldeón Malpartida

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

Lima, 08 de noviembre de 2019

 
Dra. Mónica Arakaki Makishi
JEFA (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

MANAB

ANEXO D. EVIDENCIAS FOTOGRÁFICAS DEL TRABAJO DE CAMPO

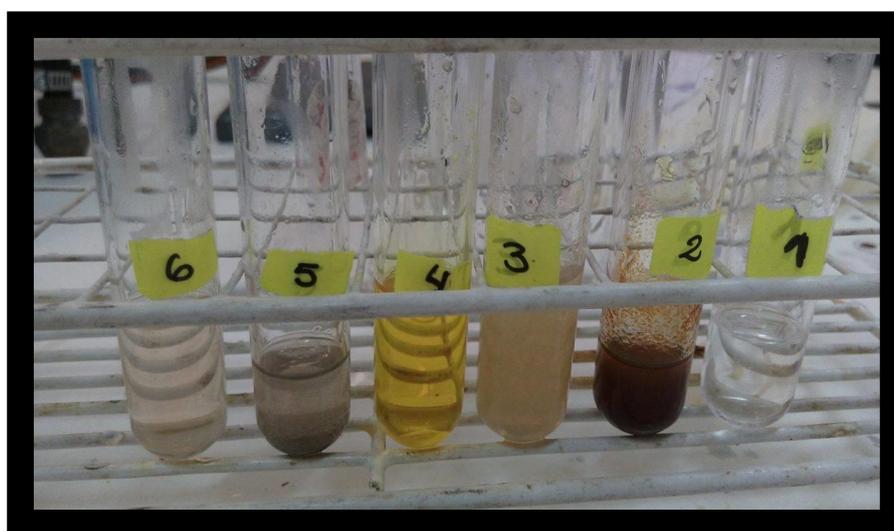


Figura N°1: Recolección de la muestra vegetal

Figura N°2: Obtención del aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck "naranja".

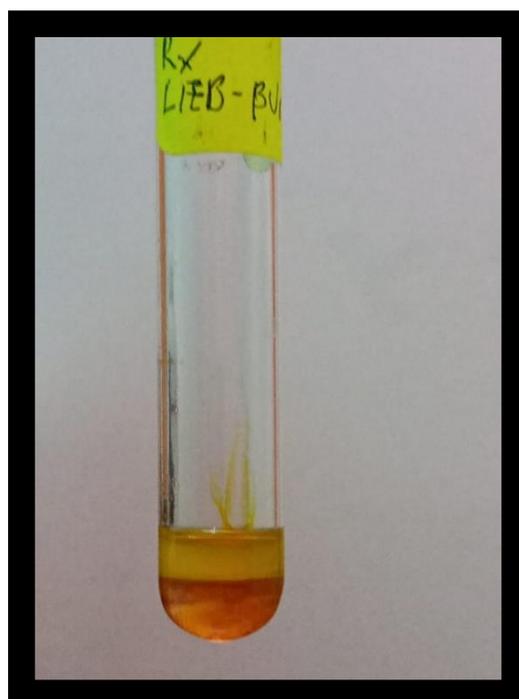
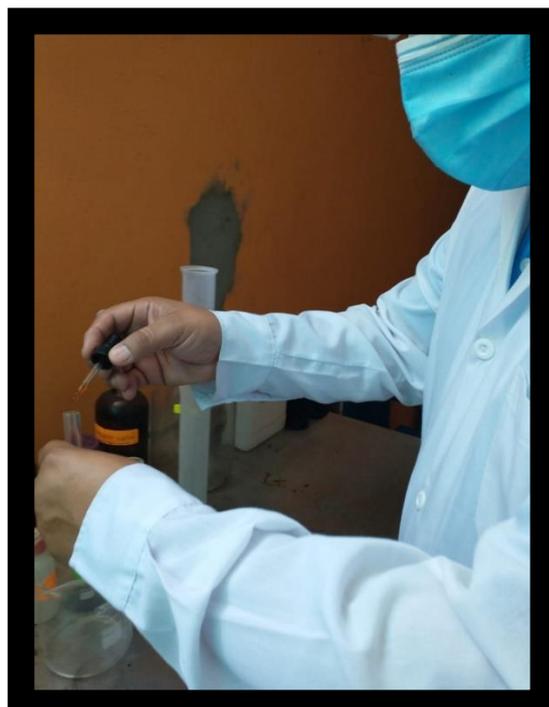


Figura N°3: Ensayo de miscibilidad



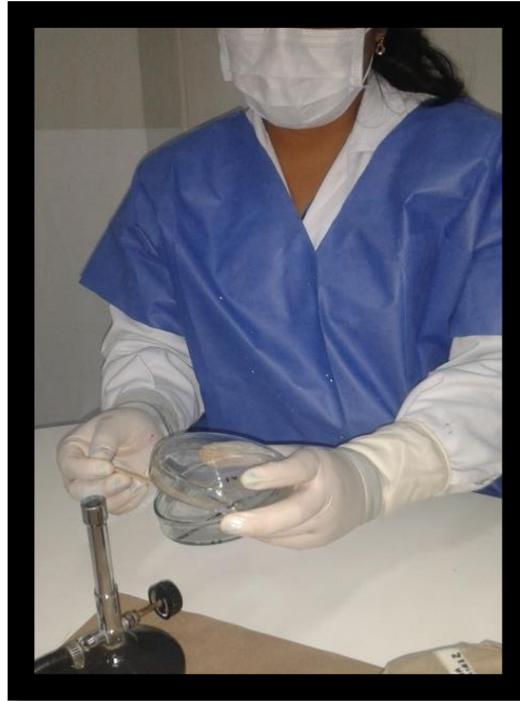
Prueba de miscibilidad con todos los reactivos mencionados.

Figura N°4: Análisis Químico del Aceite esencial



Se realizó el análisis químico y se reconoció los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck "naranja"

Figura N°5: Inoculación e incubación de la muestra



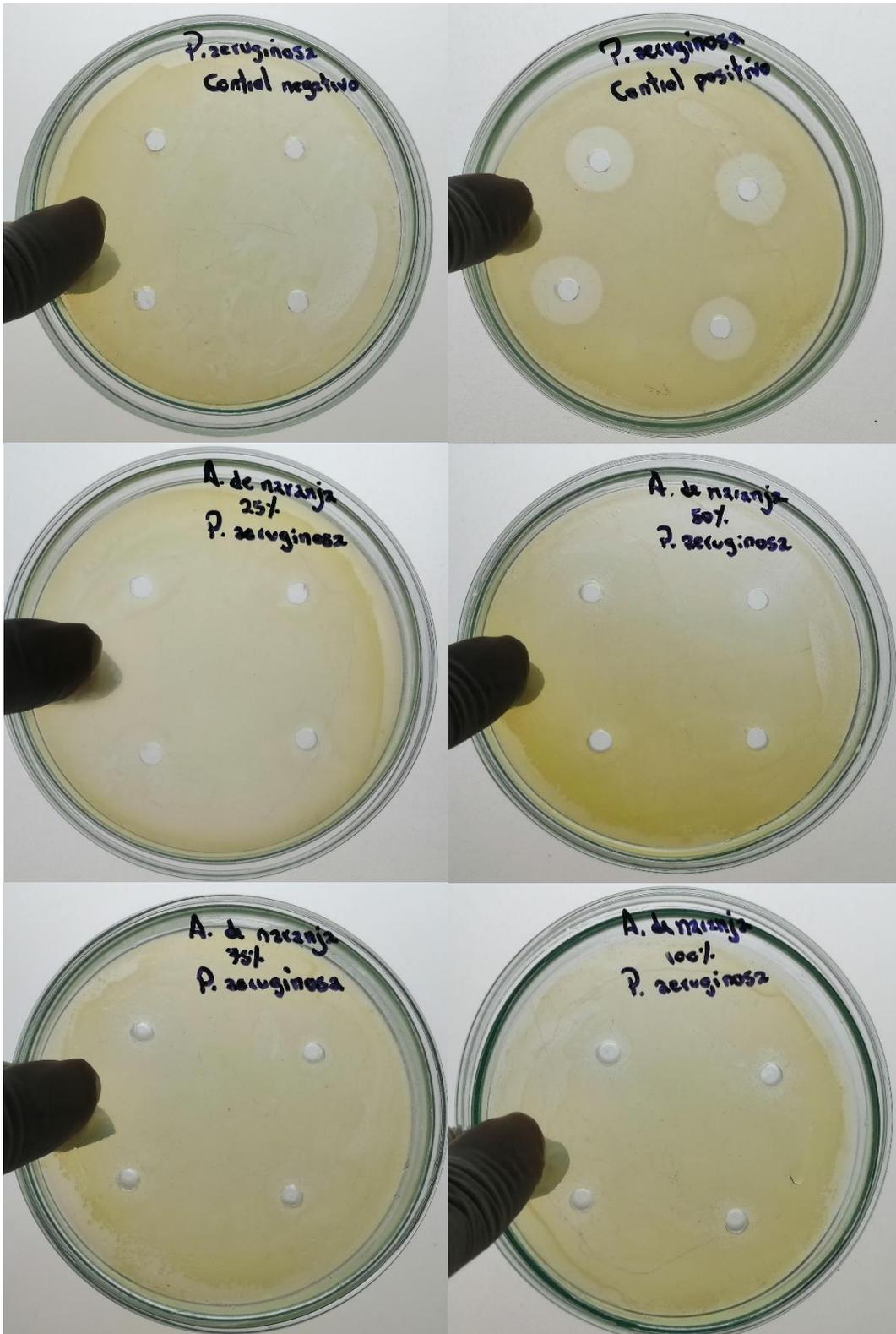
Se procede al sembrado de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las cáscaras de *citrus sinensis* (l.) Osbeck "naranja" frente a las cepas bacterianas.



Se lleva a incubación a 37°C por 24 horas.

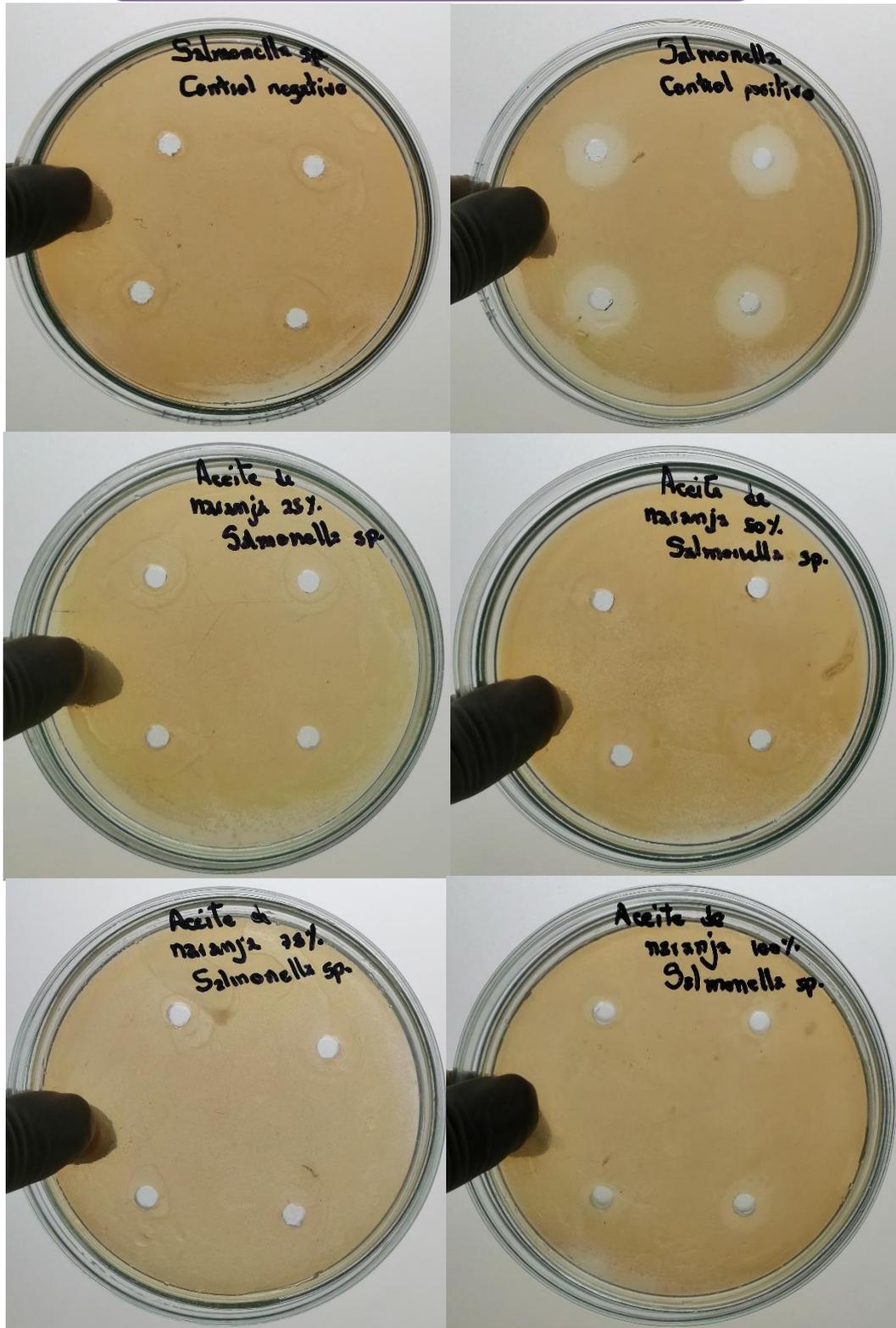
Figura N°6: Lectura e interpretación de los resultados

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

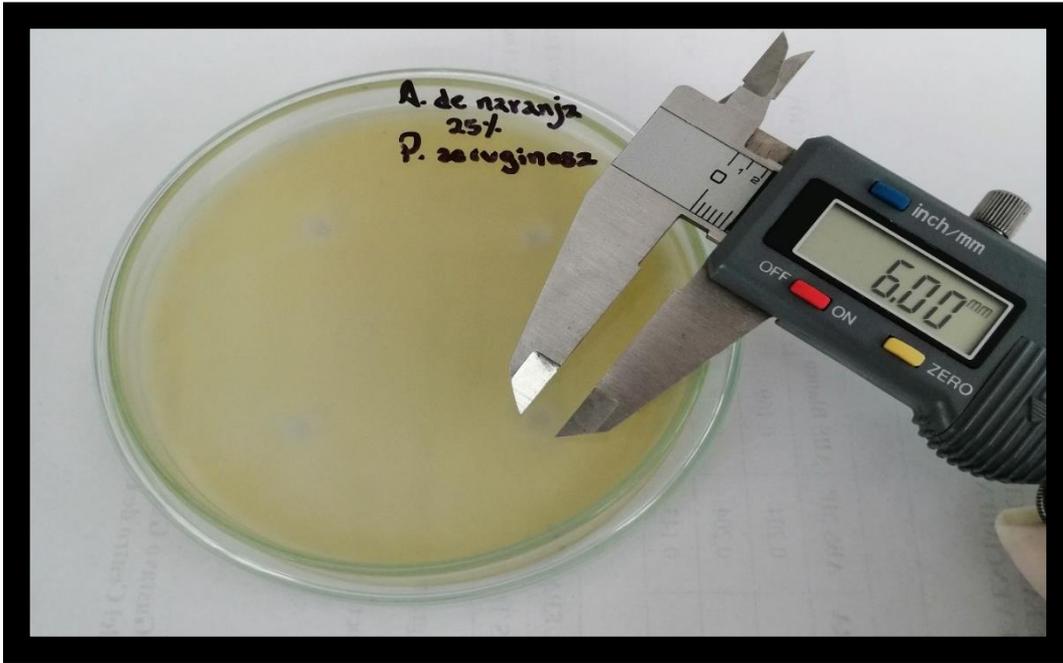


Halos de inhibición producido por el aceite esencial frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Salmonella typhimurium ATCC 14028



Halos de inhibición producido por el aceite esencial frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028



Medición del halo de inhibición del aceite esencial al 25% frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.



Medición del halo de inhibición del aceite esencial al 25% frente a la cepa de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

ANEXO E. Informe del análisis de la actividad antibacteriana



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00145-CPF-2020

ORDEN DE ANÁLISIS : 005745/2020
SOLICITADO POR : Fredy Edgard Blas Espinoza
MUESTRA : ACEITE ESENCIAL DE Citrus sinensis (L.)
Osbeck "naranja"
NÚMERO DE LOTE : -----
CANTIDAD : 01 frasco x 2 ml. aprox.
FECHA DE RECEPCIÓN : 28 de Octubre del 2020
FECHA DE FABRICACIÓN : -----
FECHA DE VENCIMIENTO : -----

MICROORGANISMOS	DIAMETRO DE INHIBICIÓN EN MILÍMETROS					
	Control	Blanco	100%	75%	50%	25%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15.71	6	6	6	6	6
	15.47	6	6	6	6	6
	15.75	6	6	6	6	6
	15.58	6	6	6	6	6
<i>Salmonella typhimurium</i>	16.26	6	6	6	6	6
	16.32	6	6	6	6	6
	16.21	6	6	6	6	6
	16.29	6	6	6	6	6

*El tamaño de los pocillos es de 6mm, por lo tanto cuando se reporta esta medida indica que no hay formación de halo de inhibición.

*Concentración del inóculo: 1×10^8 UFC/mL

*Control positivo: neomicina sulfato 0.2mg/mL

*Control negativo: DMSO (dimetil sulfóxido)

Lima, 11 de Noviembre de 2020

Q.F. Gustavo Guerra Brizuela
Director del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
(511) 619-7000 anexo 4824 ☒ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



ANEXO F: Ficha Técnica Microbiológica

- *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> Catalog Number: 0421 Lot Number: 421-378** Reference Number: ATCC® 14028™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2021/2/28 Release Information: Quality Control Technologist: Mary L Bowman Release Date: 2019/3/18
--	--

Performance	
Macroscopic Features: Medium, gray/white, circular, convex colonies. Microscopic Features: Gram negative straight rod.	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase(Kovacs): negative Hektoen Enteric agar: good growth, blue-green colonies with black centers (1) <i>Salmonella</i> O antiserum Factor O:4 (Included in group B): positive (1) <i>Salmonella</i> O antiserum Factor O:5 (Included in group B): positive (1) <i>Salmonella</i> O antiserum Factor O:12 (Included in group B): positive <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE </div>

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Catalog Number: 0693 Lot Number: 693-165** Reference Number: ATCC® 9027™** Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2021/4/30 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A Blenker Release Date: 2019/6/12
---	--

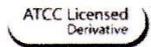
Performance	
Macroscopic Features: Large, low convex, circular to irregular shaped, rough, gray with weak beta hemolysis; 2 colony types, one is flatter, spreading & the other is smaller, lighter in color. Microscopic Features: Straight or slightly curved gram negative rod.	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): positive (1) Motility B Medium: positive <div style="text-align: center;">  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE </div>

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



ANEXO F: MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO: DETERMINACIÓN DE LA 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

PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p>Problema General</p> <p>¿Tendrá actividad antibacteriana el aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja”, frente a <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, <i>in vitro</i>?</p> <p>Problemas Específicos</p> <p>a) ¿Qué grupo de metabolitos secundarios estarán</p>	<p>Objetivo General</p> <p>Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja”, frente a <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, <i>in vitro</i>.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>Evaluar los grupos de metabolitos secundarios presentes en el aceite</p>	<p>Hipótesis General</p> <p>El aceite esencial de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja” presenta actividad antibacteriana frente a <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, <i>in vitro</i>.</p> <p>Hipótesis Específicas</p> <p>El aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja” posee metabolitos secundarios</p>	<p>Variable Independiente</p> <p>Aceite esencial de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja”</p> <p>Variable Dependiente</p> <p>Actividad antibacteriana frente a <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y</p>	<p>Enfoque y diseño de investigación</p> <p>Enfoque: Cuantitativo Diseño: Experimental, explicativo, transversal y prospectivo.</p> <p>Población:</p> <p>Plantas de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja”.</p>

<p>presentes en el aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja” con actividad antibacteriana frente a las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 ?</p> <p>¿A qué concentración del aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) presentará mejor actividad antibacteriana frente a las cepas de</p>	<p>esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja”, mediante ensayos de coloración y precipitación.</p> <p>Determinar a qué concentración del aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) presentará mejor actividad antibacteriana frente a las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.</p> <p>Evaluar la sensibilidad de las cepas de <i>Salmonella</i></p>	<p>evaluados mediante ensayos de coloración y precipitación.</p> <p>A mayor concentración del aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) posee mejor actividad antibacteriana frente a las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.</p> <p>El aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja”, presenta mejor actividad comparado con el control positivo, evidenciando una mayor sensibilidad de las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027</p>	<p>Cepas de <i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028</p> <p>Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027</p> <p>Muestra</p> <p>4 kg de cáscaras de los frutos de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja”</p>
---	--	--	--	--

<p><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027?</p> <p>¿Cuál será la sensibilidad de las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 frente al aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja”, comparado con el control positivo?</p>	<p><i>typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 frente al aceite esencial de las cáscaras de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck “naranja”, comparado con el control positivo.</p>			
---	--	--	--	--

