



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES**

CARRERA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

**Determinación de la actividad biológica del aceite
esencial de las hojas de *Citrus x limonia*.**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

BIOQUIMICO FARMACEUTICO

Autor: Coque Saetama, Wolter Anderson

Director: Valarezo Valdez, Benito Eduardo

LOJA

2024



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2024

Aprobación del director del trabajo de titulación

Loja, 20 de marzo de 2024

Magister,
Claudia Teresa Cruz Erazo
Director de la carrera de Bioquímica y Farmacia
Ciudad. - Loja

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Titulación denominado: Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia* realizado por Wolter Anderson Coque Saetama ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: Dr. Benito Eduardo Valarezo Valdez

C.I.: 1103906473

Correo electrónico: bevalarezo@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Wolter Anderson Coque Saetama, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor del Trabajo de Titulación denominado: Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia*, de la carrera de Bioquímica y Farmacia, específicamente de los contenidos comprendidos en: Marco teórico, Materiales y métodos; y, Resultados y discusión, siendo Dr. Benito Eduardo Valarezo Valdez, director del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación con la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....

Autor: Wolter Anderson Coque Saetama

C.I.: 1900675933

Correo electrónico: wacoque@utpl.edu.ec

Dedicatoria

A mis padres por ser el soporte que necesitaba en todo momento y nunca dejarme rendir en mi formación académica. Por los valores que me enseñaron desde casa y gracias a ellos me ha tocado la mejor herencia que un hijo puede tener, la educación. A mi sobrina por ser mi motor y a mis hermanos que han sido una gran inspiración para mí.

Agradecimiento

Quiero agradecer primeramente a mi tutor el Dr. Eduardo Valarezo por darme la oportunidad de poder realizar mi trabajo de titulación. A mi familia por las oportunidades que me ha dado para formarme profesionalmente, a mis hermanos por sus consejos y por último a la UTPL por formarme ética y profesionalmente para ejercer mi carrera como un gran profesional.

Índice de contenido

Carátula.....	I
Aprobación del director del trabajo de titulación	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria	V
Agradecimiento.....	VI
Índice de contenido	VII
Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo uno.....	5
Marco teórico	5
1.1 Aceites esenciales	5
1.1.1 <i>Clasificación de los aceites esenciales</i>	5
1.1.1.1 Consistencia	5
1.1.1.2 Origen.....	5
1.1.1.3 Por su naturaleza química.....	6
1.1.2 <i>Propiedades de los aceites esenciales (AE)</i>	6
1.1.2.1 Uso y aplicaciones de los aceites esenciales.....	6
1.1.3 <i>Métodos de extracción de los aceites esenciales</i>	7
1.1.3.1 Prensado.	7
1.1.3.2 Extracción con solventes volátiles.....	7
1.1.3.4 Extracción con fluidos supercríticos	8
1.1.3.5 Destilación por arrastre de vapor con agua.....	8
1.1.4 <i>Caracterización de los aceites esenciales</i>	9
1.1.4.1 Cromatografía de gases acoplada al espectro de masas (GC-MS)	10
1.1.4.2 Cromatografía de gases con detector de llama (GC-FID)	10

1.2 Actividad biológica de los aceites esenciales	10
1.2.1 Actividad antimicrobiana.....	11
1.2.1.1 Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	11
1.2.1.2 Bacterias.	11
1.2.1.2.1 Bacterias gram- positiva	12
1.2.1.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.2.1.2.3 <i>Enterococcus faecalis</i>	12
1.2.1.2.4 <i>Enterococcus faecium</i>	13
1.2.1.2.5 <i>Listeria monocytogene</i>	13
1.2.1.2.6 Bacterias gram- negativas.....	13
1.2.1.2.7 <i>Escherichia coli</i>	13
1.2.1.2.8 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	14
1.2.1.2.9 <i>Salmonella typhimurium</i>	14
1.2.1.2.10 <i>Campylobacter jejuni</i>	14
1.2.2 Actividad antifúngica.....	14
1.2.3 Actividad antioxidante.....	15
1.2.3.1 Método ABTS	15
1.2.3.2 Método DPPH	15
1.2.4 Actividad anticolinesterasa.....	16
1.3 Plantas medicinales	16
1.3.1 Flora ecuatoriana	17
1.4 Familia Rutaceae.....	17
1.4.1 <i>Citrus x limonia</i>	18
Capítulo dos	20
Materiales y métodos.....	20
2.1 Metodología.....	20
2.2 Adquisición de la muestra.....	21

2.3 Determinación de la composición química	21
2.3.1 Preparación de la muestra.....	22
2.3.2 Corrida cromatográfica en la columna TR-5MS acoplada a espectrometría de masas.....	22
2.3.3 Corrida cromatográfica en la columna TR-5MS acoplada al detector de ionización de llama.....	23
2.4 Determinación de la actividad antimicrobiana.....	24
2.5 Determinación de la actividad antioxidante	27
2.5.1 Método DPPH	27
2.5.2 Método ABTS.....	28
2.6 Determinación de la actividad acetilcolinesterasa	29
Capítulo tres.....	30
Resultados y discusión	30
3.1 Adquisición de la muestra de aceite esencial.....	30
3.2 Composición química del aceite esencial de <i>Citrus x limonia</i>	30
3.3 Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Citrus x limonia</i>	33
3.4 Actividad antifúngica del aceite esencial de <i>Citrus x limonia</i>	36
3.5 Actividad antioxidante del aceite esencial <i>Citrus x limonia</i>	37
3.6 Actividad acetilcolinesterasa del aceite esencial de <i>Citrus x limonia</i>	38
Conclusiones	41
Recomendaciones	42
Referencias	43

Índice de tablas

Tabla 1 Condiciones para operar la columna TR5-MS en GC-MS	23
Tabla 2 Condiciones para operar la columna TR5-MS en GC-FID	24
Tabla 3 Condiciones de crecimiento óptimas para las cepas bacterianas	26
Tabla 4 Condiciones óptimas de crecimiento para hongos y levaduras	27
Tabla 5 Composición química del AE de las hojas de <i>Citrus x limonia</i>	32
Tabla 6 Resultados de la actividad antimicrobiana del AE de <i>Citrus x limonia</i>	34
Tabla 7 Resultados de la actividad antifúngica del AE de <i>Citrus x limonia</i>	37
Tabla 8 Resultados de los ensayos del método ABTS y DPPH.....	38
Tabla 9 Resultados de los ensayos de la actividad acetilcolinesterasa	39

Índice de figuras

Figura 1 Equipo de extracción soxhlet.....	8
Figura 2 Equipo de destilación por arrastre de vapor	9
Figura 3 Célula eucariota	12
Figura 4 Árbol de <i>Citrus x limonia</i>	19
Figura 5 Metodología de trabajo	20
Figura 6 Viales de aceite esencial de <i>Citrus x limonia</i>	21
Figura 7 Cromatograma de la columna TR5-MS del aceite esencial de las hojas de <i>Citrus x limonia</i>	30
Figura 8 Concentración IC ₅₀ del aceite esencial de las hojas de <i>Citrus x limonia</i>	39

Resumen

Citrus x limonia es una especie híbrida en la familia de los cítricos comprende la fusión del limón y la mandarina. En la presente investigación se buscó determinar la actividad biológica de esta especie mismas que comprenderán la actividad antimicrobiana, antifúngica, antioxidante y la actividad acetilcolinesterasa. La obtención de la muestra de aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia* se lo obtuvo mediante la técnica de destilación por arrastre con vapor de agua. Una vez obtenido los viales con la muestra se buscó identificar la composición química del aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia* mismo que se lo realizó por cromatografía de gases, los compuestos mayoritarios encontrados fueron: limonene (24.63%), pinene β- (23.29%), citronellal (15.91%), sabinene (8.35%) y Cineole $1,8$- (6.03%). La actividad antimicrobiana y antifúngica se la determinó a través del método de microdilución en caldo en la que se utilizaron varias cepas bacterianas de tipo Gram negativas y Gram positivas. Los resultados obtenidos se los determinó por medio de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en la cual para las cepas bacterianas de *E. faecalis* (1000 $\mu\text{g/mL}$) y *Listeria monocytogenes* (1000 $\mu\text{g/mL}$) presentan una actividad antimicrobiana moderada. Del mismo modo las cepas de hongos y levaduras *Candida albicans* (250 $\mu\text{g/mL}$) y *Aspergillus niger* (500 $\mu\text{g/mL}$) presentan una actividad fuerte. Para la actividad antioxidante utilizados dos métodos diferentes ABTS y DPPH en el que se obtuvieron resultados no muy favorables en el método ABTS se evidenció una SC_{50} (9115.15 \pm 2.13 $\mu\text{g/mL}$) que nos indica una actividad antioxidante muy baja, de la misma forma el método DPPH no se evidenció ninguna actividad a la máxima capacidad testada. Por medio del método colorimétrico de Ellman pudimos determinar la actividad anticolinesterasa de nuestro aceite esencial mismo que presentó una actividad moderada (71.02 \pm 1.02 $\mu\text{g/mL}$) en comparación a los valores de referencia ya establecidos.

Palabras clave: aceite esencial, colorimétrico, microdilución.

Abstract

Citrus x limonia is a hybrid species in the citrus family comprising the fusion of lemon and mandarin. In the present research we sought to determine the biological activity of this species, including antimicrobial, antifungal, antioxidant and acetylcholinesterase activity. The essential oil sample of *Citrus x limonia* leaves was obtained by steam distillation technique. Once the vials with the sample were obtained, the chemical composition of the essential oil of the leaves of *Citrus x limonia* was identified by gas chromatography, the major compounds found were: limonene (24.63%), pinene β-> (23.29%), citronellal (15.91%), sabinene (8.35%) and cineole $1,8$-> (6.03%). The antimicrobial and antifungal activity was determined through the broth microdilution method using several Gram-negative and Gram-positive bacterial strains. The results obtained were determined by means of the minimum inhibitory concentration (MIC) in which the bacterial strains of *E. faecalis* (1000 $\mu\text{g/mL}$) and *Listeria monocytogenes* (1000 $\mu\text{g/mL}$) showed moderate antimicrobial activity. Similarly, the fungi and yeast strains *Candida albicans* (250 $\mu\text{g/mL}$) and *Aspergillus niger* (500 $\mu\text{g/mL}$) showed strong activity. For the antioxidant activity we used two different methods ABTS and DPPH in which we obtained not very favorable results in the ABTS method, which showed a SC50 ($9115.15 \pm 2.13 \mu\text{g/mL}$) indicating a very low antioxidant activity, in the same way the DPPH method did not show any activity at the maximum capacity tested. By means of the Ellman colorimetric method, we were able to determine the anticholinesterase activity of our essential oil, which showed a moderate activity ($71.02 \pm 1.02 \mu\text{g/mL}$) compared to the already established reference values.

Keywords: essential oil, colorimetric, microdilution.

Introducción

El presente trabajo final de titulación está enfocado en evaluar la actividad biológica del aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia*. La investigación desarrollada está estructurada en tres capítulos los cuales se menciona a continuación capítulo 1: consta del marco teórico en donde se mencionan los temas a desarrollarse, capítulo 2: menciona los materiales y métodos que se utilizaron para desarrollar la investigación, el capítulo 3 presenta los resultados y su discusión respectiva basándose en los ensayos experimentales realizados.

Estos trabajos de investigación son de vital importancia ya que con el pasar de los años se ha podido constar que varias especies vegetales presentan un alto potencial terapéutico, así mismo los aceites esenciales de especies vegetales son de gran aporte en la industria farmacéutica, cosmetológica e incluso la alimentaria.

El objetivo general de esta investigación fue determinar la actividad biológica del aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia* con el fin de poder determinar moléculas con alto potencial terapéutico o que nos sirvan para la elaboración de otros derivados de productos naturales.

En esta investigación se pudo cumplir con todos los objetivos planteados de los cuales la actividad antimicrobiana y antifúngica determinó la concentración mínima inhibitoria de las diferentes cepas bacterianas testeadas a través del método de microdilución en caldo.

La actividad antioxidante se determinó utilizando los métodos espectrofotométricos ABTS y DPPH en los cuales se buscó determinar la interacción de nuestro aceite esencial con el radical libre del ion ABTS.

Se determinó la actividad anticolinesterasa a través del método colorimétrico de Ellman el cual consiste en inhibir la enzima colinesterasa es por eso que el estudio de esta actividad es de gran aporte para el campo medico ya que esta enzima actúa en el cerebro y

se liga específicamente a la enfermedad del Alzheimer y mediante el estudio de aceites naturales se busca inhibir esta enzima.

Es muy importante seguir con las investigaciones de aceites esenciales en especies vegetales con el fin de ampliar el conocimiento sobre el manejo y su uso, mismos que pueden ser aplicados en la medicina natural y otras áreas que implique la elaboración de nuevos productos a través del uso de aceites esenciales.

Capítulo uno

Marco teórico

1.1 Aceites esenciales

También considerado como esencias, son una mezcla compleja de sustancias aromáticas las cuales se encargarán de dar la fragancia a las flores, varias de estas esencias poseen numerosas acciones farmacológicas.

Pero principalmente forman parte de la base de la aromaterapia y son muy utilizados en el campo de la cosmetología, perfumería, licorería, confitería y en la industria alimentaria.

López Luegon (2004) menciona que los aceites esenciales son aceites volátiles responsables de las fragancias de las flores y otros órganos vegetales. En la actualidad, se emplea esta definición a las esencias obtenidas mediante arrastre de vapor o por expresión del pericarpio en el caso de cítricos.

1.1.1 Clasificación de los aceites esenciales (AE)

La clasificación de los aceites AE según (Martínez, 2001) se basa en diferentes criterios: su origen, consistencia y su naturaleza química de los compuestos mayoritarios.

1.1.1.1 Consistencia. Por su consistencia se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas se catalogan como líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos presentan una consistencia más espesa, tienen poca volatilidad y propensos a sufrir reacciones de polimerización. Las oleorresinas contienen el aroma de las plantas de forma concentrada y se presentan en forma líquida muy viscosa o a su vez en forma semisólida (caucho, gutapercha, chicle, balata) (Martínez, 2001).

1.1.1.2 Origen. De acuerdo con su origen podemos encontrarlos como aceites naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se los obtiene directamente de la planta y no presentan modificaciones físicas ni químicas, algo importante de recalcar es que por su rendimiento tan bajo pueden tener precios muy costosos. Los artificiales se los obtiene mediante procesos de enriquecimiento del mismo aceite esencial con uno o varios de sus

componentes. Los sintéticos son más económicos y son producidos por la combinación de sus componentes producidos a través de síntesis química (Martínez, 2001).

1.1.1.3 Por su naturaleza química. Desde la parte química y por su composición compleja con diferentes tipos de sustancias se pueden clasificar de acuerdo con sus compuestos mayoritarios, es decir los aceites ricos en monoterpenos son considerados aceites esenciales monoterpenoides, los aceites ricos en sesquiterpenos se los denomina aceites esenciales ricos en sesquiterpenoides y los aceites ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales ricos en fenilpropanoides. Aunque sea una clasificación muy redundante nos será de gran ayuda para para estudiar algunos aspectos fitoquímicos de los monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Martínez, 2001).

1.1.2 Propiedades de los aceites esenciales

Desde la autoría de López L., (2004) nos menciona varias propiedades de los AE de las cuales las más destacadas son las propiedades farmacológicas que pueden presentarse de forma muy variable debido a la heterogeneidad que presentan sus componentes, las moléculas de estos componentes presentes en los AE de diferentes especies vegetales poseen un gran poder terapéuticos lo cual ha sido un gran beneficio que ha sabido ser aprovechado en la aromaterapia.

Así mismo menciona las propiedades toxicológicas que los AE pueden presentar ya que la mala administración o el mal manejo de estas esencias puedan presentar una sobredosificación incluso si se trata de AE de especies que pueden ser muy poco tóxicas, esto se debe a que algunos AE pueden presentar una toxicidad específica por poseer compuestos que atraviesen la barrera hematoencefálica y que puedan afectar al sistema nervioso central.

1.1.2.1 Uso y aplicaciones de los aceites esenciales. La vía oral que es específica para tratar las infecciones internas por su acción terapéutica rápida, la vía inhalatoria en la cual se debe utilizar difusores para tratar patologías respiratorias, se

debe tener precaución con pacientes asmáticos ya que la inhalación directa no es recomendada.

1.1.3 Métodos de extracción de los aceites esenciales

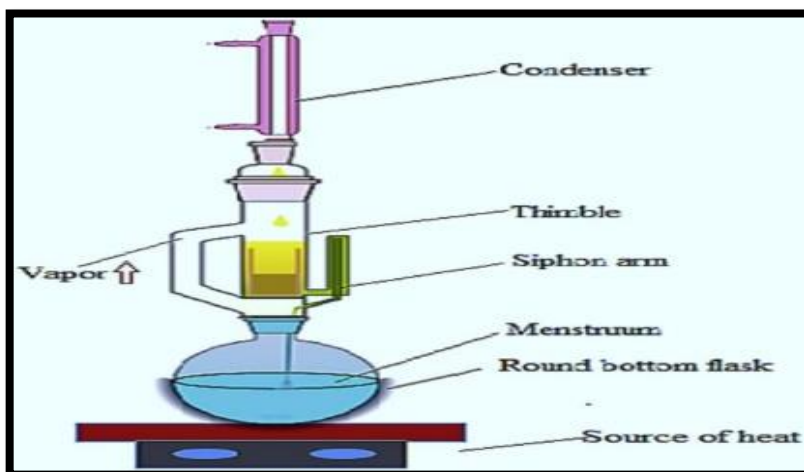
Los autores Rodríguez, Alcaraz & Real (2012) nos mencionan que los AE pueden obtenerse mediante diferentes métodos de extracción como: prensado, destilación con vapor de agua, extracción con volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos.

1.1.3.1 Prensado. El método de prensado consiste en exprimir el material vegetal mecánicamente con el objetivo de obtener el aceite esencial, recolectarlo y filtrarlo. Es el método más usado para la obtención de AE de especies cítricas.

1.1.3.2 Extracción con solventes volátiles. Se debe tratar previamente el material vegetal es decir secado y molido, luego ponerlo en contacto con los solventes volátiles (alcohol o cloroformo), además de extraer el aceite esencial se puede obtener otras sustancias como grasas y ceras lo que genera una esencia con impurezas por lo tanto estos AE se los utiliza en los laboratorios y no a nivel industrial ya que los solventes son costosos y no les conviene obtener aceite esencial con impurezas. Para la aplicación de este método utilizares un equipo de extracción soxhlet (Figura 1) para lo cual debemos triturar previamente el material vegetal con el fin de que el material vegetal este en contacto con el solvente hasta obtener el AE.

Figura 1

Equipo de extracción soxhlet



Nota. Adaptado del equipo de extracción Soxhlet, por (Prusty, 2022)

(<https://n9.cl/xwysn>)

1.1.3.3 Método enfleurage. Este método se aplica especialmente en las flores en donde el material vegetal se pone en contacto con una grasa que actuara como vehículo extractor, en la cual se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y grasa la cual posteriormente será separada a través de métodos fisicoquímicos. Por su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor lo hacen un método muy costoso.

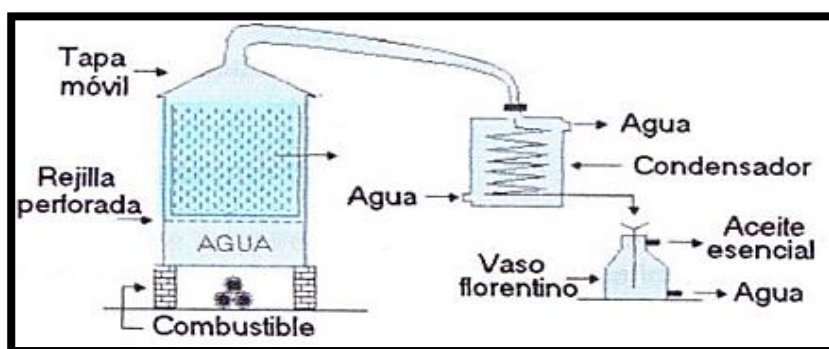
1.1.3.4 Extracción con fluidos supercríticos. Se debe cortar el material vegetal en trozos pequeños, se los tritura y se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido supercrítico como el CO₂ o algún otro tipo de cosolvente dependiendo el fin con el que se realice esta extracción. En aceites esenciales son solubilizados y arrastrados mientras que el solvente extractor es eliminado por descompresión progresiva hasta alcanzar una presión y temperatura ambiente. La pureza del aceite esencial obtenido por este método dependerá de las condiciones de extracción.

1.1.3.5 Destilación por arrastre de vapor con agua. Es una de las técnicas más usadas por su fácil ejecución y su producción de aceites esenciales de alta calidad. La

técnica consiste en vaporizar los líquidos inmiscibles a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce una doble función la de calentar la mezcla hasta el punto de ebullición y la de disminuir la temperatura de ebullición al adicionar la presión del vapor, con el fin de que los vapores que salen se enfríen hasta condensar y los líquidos inmiscibles (agua y aceite) se separen por gravedad (Armijo et al., 2012).

Figura 2

Equipo de destilación por arrastre de vapor



Nota. Adaptado de la imagen de destilación por arrastre de vapor, por (Bandwolf, 2003), (<https://n9.cl/37a7ww>).

1.1.4 Caracterización de los aceites esenciales

Los autores Dellacassa, Lorenzo y Paz (2004) mencionan que las características químico-analíticas de los aceites esenciales se debe a el desarrollo de las técnicas de análisis, sobre todo las técnicas cromatográficas, y en particular la cromatografía gaseosa.

Las técnicas de control analíticas deben diferenciarse de manera específica de las técnicas que son utilizadas en la investigación de la composición química de los aceites esenciales.

A su vez, para el análisis químico podemos encontrar técnicas como la cromatografía de gases con detector de llama (GC-FID), la cual nos permite determinar compuestos volátiles de una manera más exacta.

La cromatografía de gases acoplada a espectrofotómetro de masas (GC-MS) es otra de las técnicas que se utiliza para la identificación de compuestos presentes en aceites esenciales.

1.1.4.1 Cromatografía de gases acoplada al espectro de masas (GC-MS).

Gutiérrez y Droguet (2002), nos mencionan que para uso de esta técnica se debe inyectar una mezcla de compuestos en la columna cromatográfica con el fin de obtener la elución sucesiva de los compuestos individuales aislados que pasan inmediatamente en el espectrómetro de masas, las cuales se registraran en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas.

1.1.4.2 Cromatografía de gases con detector de llama (GC-FID). Langley, Cancho y Herniman (2022) describen a FID como un detector que se utiliza normalmente con CG en el cual un eluyente gaseoso se quema en una llama, produciendo así iones en fase gaseosa de los analitos que se detectan usando un electrodo.

A su vez el gas procedente de la columna se mezcla con el hidrogeno la mezcla resultante se quema en una cámara con oxígeno, en la parte superior de la llama se coloca un colector cilíndrico polarizado que se encargara de recoger los iones generados, a su vez se mide la corriente iónica que se establece entre la punta del quemador con el electrodo recolector.

1.2 Actividad biológica de los aceites esenciales

En la actualidad se ha podido comprobar que varias especies vegetales presentan diferentes propiedades (antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, etc.) que pueden ser aprovechadas para fines investigativos y para el desarrollo de nuevos productos naturales.

El autor Llorens (2021) nos menciona que los aceites esenciales han sido objeto de crecimiento más allá de sus tradicionales aplicaciones en la cosmética y aromaterapia gracias a su amplio espectro de actividades biológicas mismas que se encuentran relacionadas principalmente con la medicina, el sector agroalimentario entre otras.

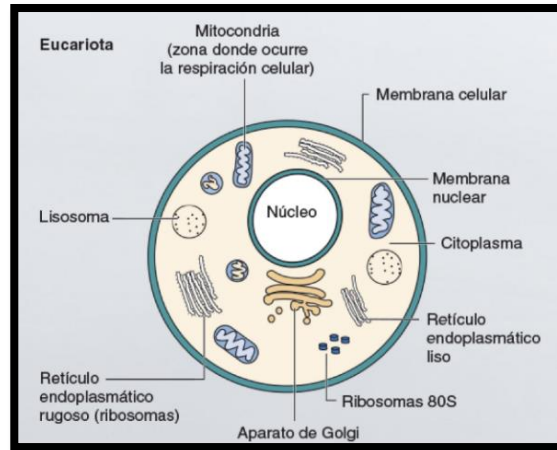
1.2.1 **Actividad antimicrobiana**

Considerando la gran variedad de compuesto químicos presentes en los aceites esenciales se puede deducir que su actividad antimicrobiana no es atribuible a un mecanismo específico si no a la acción combinada de varios de ellos.

Zekaria (2006) menciona que los aceites esenciales son más activos contra bacterias Gram positivas, esto puede deberse a una influencia en la estructura de la pared celular y la composición de la membrana externa de las bacterias y su interacción con los aceites esenciales de naturaleza lipofílica. En el caso de las bacterias Gram negativas sensibles y Gram positivas los aceites esenciales son introducidos a través de los lípidos de la membrana celular y mitocondrial alterando su estructura y haciéndola más permeables.

1.2.1.1 Concentración mínima inhibitoria (CMI). De acuerdo con Ramírez y Marín (2009) la MIC es un proceso de cuantificación *in vitro* de los antimicrobianos que se evalúa habitualmente mediante algunas variantes de los métodos de dilución, este proceso se ha establecido como “*gold Standard*” frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de que se puede confirmar resistencias inusuales y nos ayuda con resultados definitivos cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado.

1.2.1.2 Bacterias. Se considera a las bacterias como organismos procariotas unicelulares que podemos encontrarla por todas partes. Son de vital importancia para los ecosistemas del planeta y se conoce que varias especies pueden vivir en condiciones extremas de temperatura y presión. Nuestro cuerpo humano se encuentra plagado de bacterias la mayoría buenas y no son perjudiciales para nuestra salud, pero por otro lado las bacterias perjudiciales que son las patogénicas y son responsables de que nuestro organismo adquiera alguna enfermedad por estas mismas.

Figura 3*Célula eucariota*

Nota. Adaptado de la célula eucariota, por,
(Murray et al., n.d.) (<https://n9.cl/oe2x1>).

1.2.1.2.1 Bacterias gram- positivas. De acuerdo con Bush (2023) las Gram positivas se clasifican por el color que adquieren después de realizarles el proceso de tinción Gram. las bacterias Gram positivas se tiñen de azul y podemos encontrarlas de diferentes formas: esferas (cocos), bastones (bacilos) y hélices (espiroquetas)

1.2.1.2.2 *Staphylococcus aureus*. Es una bacteria en forma esférica que tiende a organizarse en grupos en forma de uvas. En los medios, estos organismos llegan a crecer hasta en un 10% de sal y las colonias tiene un color amarillo o dorado. Estos organismos pueden crecer tanto aeróbicamente como anaeróbicamente a temperaturas de 18 y 40°C. las pruebas bioquímicas para esta sepa suelen ser una catalasa positiva, coagulasa positiva, es sensible a novobiocina y fermentación de manitol positiva (Taylor & Unakal, 2022).

1.2.1.2.3 *Enterococcus faecalis*. Es una bacteria en forma de coco que se la encuentra en cadenas o pares, es una bacteria inmóvil y no esporulado, su tamaño esta alrededor de 0,5 y 0,8 micrómetros y por lo general se ubican en el tracto gastrointestinal humano. Posee una pared celular con antígenos del grupo D, el cual es un ácido

lipoteicoico que se encuentra asociado con la membrana citoplasmática de la bacteria misma que contiene residuos de glicerol (Pardi et al., 2009)

1.2.1.2.4 *Enterococcus faecium*. Las infecciones que son causadas por estas bacterias tienen un mal pronóstico a comparación con *E.faecalis*. *E. faecium* presenta un alto grado de resistencia a los antibióticos lo que la hace difícil de erradicar. La bacteriemia por *Enterococcus* se asocia a una elevada mortalidad misma que aumentara cuando son cepas resistentes a gentamicina (HLGR). En los últimos años se ha evidenciado el aumento de resistencia a vancomicina ya que en los años noventa la resistencia a vancomicina era menor del 1% y actualmente está entre el 30% y es más común en cepas de *E.faecium* (Arredondo et al., 2018)

1.2.1.2.5 *Listeria monocytogenes*. Forma parte de la familia *Listeiraceae*, del género *Listeria* con características anaerobias y facultativas. Las reservas de esta bacteria se encuentran en el tracto gastrointestinal de los animales, verduras, o alimentos listos para el consumo (contaminados o mal cocidos), derivados de lácteos no pasteurizados, mariscos y en el suelo. Esta bacteria es capaz de sobrevivir en diferentes medios por su capacidad de adaptabilidad rápida lo cual podría explicar su gran capacidad de transmisión (Granda, 2018).

1.2.1.2.6 *Bacterias gram- negativas*. Las bacterias Gram negativas están encerradas en una cápsula protectora la cual ayuda a evitar que los glóbulos blancos ingieran a estas bacterias, bajo esta cápsula se encuentra una membrana externa que las protege contra ciertos antibióticos, como la penicilina, cuando esta membrana se deteriora libera sustancias tóxicas (endotoxinas) que aumentan la gravedad de los síntomas provocados por infecciones por bacterias Gram negativas (Bush, 2022).

1.2.1.2.7 *Escherichia coli*. Es el principal anaerobio facultativo de la flora microbiana que reside en el colon humano. El huésped es colonizado desde el nacimiento con una o dos cepas que residen de manera permanente en el intestino y establece una relación simbiótica con el individuo para toda la vida (Vidal et al., 2007)

1.2.1.2.8 *Pseudomona aeruginosa*. Es un patógeno en forma de bastón aproximadamente de 0,5 – 1 µm de diámetro y 1,5 – 5 µm de largo. Tienen un flagelo polar que le confiere motilidad. Es una bacteria aerobia facultativa debido a que tienen la capacidad de crecer en medios anaerobios y de igual manera es una bacteria muy persistente en el medio ambiente. Pueden crecer en ambientes de temperaturas elevadas (20 – 43°C) esta es una característica que la hace diferenciar de las otras especies de *Pseudomona* (Paz-Zarza et al., 2019)

1.2.1.2.9 *Salmonella typhimurium*. Es una de las principales causas de intoxicación alimentaria en países occidentales y en Estados Unidos causa alrededor de un millón de casos de enfermedades anuales. Esta bacteria invade el huésped a través de las placas de Peyer y se ligan al tejido linfoide en la parte más baja del intestino delgado. Durante la invasión hacia nuestro organismo libera flagelina a través del sistema de secreción tipo 3 (T3SS) que ayudan a evadir los comensales naturales que viven en el intestino delgado y las placas de Peyer lo que provocara una respuesta inflamatoria(Jørgensen et al., 2013).

1.2.1.2.10 *Campylobacter jejuni*. Es un patógeno que está presente de manera ubicua en muchas especies animales como un microorganismo comensal, especial mente en carnes, la manipulación de carne de pollo cruda y la contaminación cruzada de alimentos listos para el consumo son la principal fuente de transmisión de enfermedades a causa de esta bacteria (Kemper & Hensel, 2023)

1.2.2 Actividad antifúngica

La actividad antifúngica en los últimos años ha sido un gran aporte en la investigación ya que se ha podido determinar que muchas especies vegetales presentan un mecanismo de defensa solido por parte del hospedero contra los fitopatógenos. Así mismo se ha podido demostrar que los AE cuentan con varios compuestos que presentan un efecto fungicida.

En el campo de la agricultura con el fin de reducir el uso de químicos sintéticos se ha apoyado la iniciativa de la posible aplicación de AE para el control de hongos fitopatógenos (Barrera & García, 2008)

1.2.3 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se centra en la búsqueda de compuestos que sean capaces de capturar radicales del medio ambiente. Los radicales libres se producen como resultado de la oxidación celular, alteran el ADN de las células impidiendo la renovación celular o afectando su funcionamiento (Bafna & Mishra, 2005).

Hoy en día se ha evidenciado que los productos de origen vegetal son una buena alternativa al momento de usarlos como antioxidantes ya que gracias a su gran diversidad de compuestos (flavonoides, carotenoides, etc.) pueden actuar a bajas concentraciones brindando las propiedades antioxidantes necesarias para su uso.

La cuantificación de los resultados se realizó basándose en la técnica establecida por Thaipong con ciertas modificaciones, la cuantificación de los resultados se realizó en un lector de microplacas EPOCH 2 (BIOTEK, Winooski, VT, USA) a una longitud de onda de 515 nm durante 60 min.

1.2.3.1 Método ABTS. Este método se enfoca en la cuantificación del radical ABTS⁺ debido a su reducción ABTS por la acción de los antioxidantes. El radical catiónico ABTS⁺ es un cromóforo verde azulado que absorbe una longitud de onda de 734 nm y se genera una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio lo que genera que el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical ABTS⁺ este determinado por el su grado de concentración (Rioja et al., 2018)

1.2.3.2 Método DPPH. Es un método de captación de radicales libres y es muy usado en la determinación de la actividad antioxidante del material vegetal. El fundamento de este método consiste en la aceptación de una molécula de hidrogeno por la molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazina que presente en una solución de metanol adquiere una

coloración violeta. Se requiere de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm para medir la absorbancia, en el cual la solución de DPPH al reaccionar con un sustrato antioxidante el color inicial (violeta) se desvanecerá y aparecerá una coloración amarilla que es indicativo de la reducción del radical libre por antioxidantes de nuestra muestra analizada (Ruiz, 2020)

1.2.4 Actividad anticolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) es la hidrólisis del neurotransmisor Ach en las sinapsis colinérgicas, esta reacción de hidrólisis procede por ataque nucleófilo al grupo carbonilo, acilación de la enzima y liberación de Ch, seguidamente se hidroliza la enzima asilada dando como resultado el ácido acético logrando así la regeneración de la enzima. Los inhibidores que actúan sobre el centro activo de la enzima impedirán la unión de una molécula de sustrato o su hidrólisis por medio de un bloqueo del sitio por su alta actividad reaccionando irreversiblemente con la serina próxima al centro catalítico (Carretero, 2003)

1.3 Plantas medicinales

Las plantas medicinales son recursos que podemos utilizarlos para investigación o elaboración de productos que generen una acción terapéutica en nuestro organismo. Gracias a algunas partes de las plantas o a sus mismos extractos son empleados como tratamientos de algunas afecciones. La parte de la planta que es utilizada con fines medicinales se la conoce como droga vegetal la cual puede ser suministrada por diferentes formas galénicas o a su vez por medio de aceites esenciales.

El autor López (2008) menciona que el uso de las plantas medicinales como tratamiento alternativo es una práctica que ha ido aumentando con el pasar de los años, hace énfasis en el uso de la fitoterapia para tratar síntomas leves y también como tratamiento preventivo. De igual manera nos da a conocer que pueden detectarse algunas plantas medicinales en dolencias crónicas y de mayor importancia como lo son la diabetes, la hipertensión, el hipercolesterolemia e inclusive el cáncer.

1.3.1 *Flora ecuatoriana*

Ecuador se encuentra dentro de los países más biodiversos a nivel mundial tienen un 10% de todas las especies de plantas que se encuentran en todo el planeta. De este porcentaje la mayor parte crece en regiones andinas como la cordillera de los Andes, en la zona noroccidental en donde se estima que haya un aproximado de 10 mil especies vegetales. A su vez en la región Amazónica existe un elevado número de especies vegetales que están por alrededor de las 8200 especies.

La región de las islas Galápagos también contamos con 600 especies nativas de la zona y alrededor de 250 que han sido introducidas por el hombre. La gran diversidad climática de nuestro país ha sido clave para el desarrollo de más de 25 mil especies de árboles.

1.4 Familia Rutaceae

Esta familia tiene características de árboles o arbustos a veces pueden ser trepadoras, en ocasiones presentan espinas y cuentan con cavidades secretoras de esencias. Esta familia está conformada por 154 géneros que integran unas 2100 especies de distribución tropical o subtropical.

Son abundantes en países como Sudáfrica, Australia, el continente americano y escasas regiones templadas. Varias de estas especies contienen furanocumarinas, estos compuestos pueden producir dermatitis que ocasionan inflamación y por fotosensibilización pueden llegar a manchar la piel (Muñoz & Navarro, 2011).

1.4.1 *Citrus x limonia*

La especie de *Citrus x limonia* es considerado un híbrido natural en la diversidad genética de los cítricos por ser una fusión entre las especies del limón (*Citrus limón*) y la mandarina (*Citrus x tangerina*). La gran variedad genética de especies cítricas que existen a nivel mundial siempre ha sido de gran aporte para el campo agrícola, los cítricos requieren un buen manejo agronómico para poder obtener un buen material vegetal libre de plagas y enfermedades. *Citrus x limonia* o más conocido como limón mandarina es un árbol de cítricos de tamaño mediano que en ocasiones a primera vista se lo ha confundido con un árbol de mandarina u otros cítricos (Castro Morales et al., 2014).

En nuestro país se ha realizado estudios para determinar la capacidad de antioxidantes a través del zumo de *Citrus x limonia* en los cuales se evaluaron diferentes factores como la cinética de degradación en el contenido de vitamina C y carotenoides totales presentes en intervalos de 10 y 90 días. Del mismo modo se realizaron pruebas para determinar la estabilidad fisicoquímica en los cuales se pudo determinar que los mejores parámetros de conservación estuvieron a temperatura ambiente ya que se obtuvo un menor incremento de pH y menor descenso del grado de acidez con respecto a condiciones de refrigeración (Andrango & Fernando, 2021).

Figura 4

Árbol de Citrus x limonia



Nota. Adaptado de *Árbol de Citrus x limonia* por (Cetino, 2023), (<https://n9.cl/vj50g>).

Capítulo dos

Materiales y métodos

2.1 Metodología

La metodología que se utilizó en el presente trabajo de titulación se presentará a continuación en el siguiente esquema:

Figura 5

Metodología de trabajo



Muestra: *Citrus x limonia*.



Extracción del aceite esencial: destilación por arrastre de vapor con agua.



Composición química: técnica cromatográfica, acoplada a espectrometrías de masa (CG-EM)



Actividad biológica: actividad antimicrobiana, antifúngica, antifúngica y anticolinesterasa.



Actividad antioxidante: para la determinación se utilizó dos métodos espectrofotométricos: ABTS⁺ y DPPH.

2.2 Adquisición de la muestra

El material vegetal se lo obtuvo en el cantón Palanda sector Santa Ana alto perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe en las coordenadas 4°38'15.7" sur y 79°07'44.5" oeste. El aceite esencial se lo obtuvo mediante la técnica de destilación por arrastre con vapor de agua, para luego trasladar el aceite esencial obtenido a los Departamentos de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja para su respectivo análisis de actividad biológica.

Figura 6

Viales de aceite esencial de Citrus x limonia



Nota. Envases color ámbar con la muestra de aceite esencial

2.3 Determinación de la composición química

El método más utilizado para la determinación de componentes químicos existentes en muestras de aceites esenciales es la cromatografía de gases, mismo que, para el presente trabajo de fin de titulación utilizamos un cromatógrafo de gases (modelo Trace 1310, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

En el equipo podemos encontrar el software llamado "MSD-Chemstation D.01.00.SP1", este equipo está formado por un inyector automático split/splitless de serie

7683 y un detector FID el cual es abastecido por un generador de Hidrógeno llamado "Gas Generator 9150 Packard".

2.3.1 Preparación de la muestra

El primer paso por realizarse es el acondicionamiento previo de la muestra el cual nos permitirá observar que la muestra no presente impurezas o residuos de agua ya que al no percatarnos de esto podemos obtener resultados erróneos o a su vez dañar el equipo.

Una vez realizado el acondicionamiento procedemos a diluir 10 μ L del aceite esencial de *Citrus x limonia* con 990 μ L de diclorometano, este proceso se lo debe realizar por triplicado y etiquetando con su respectivo código.

2.3.2 Corrida cromatográfica en la columna TR-5MS acoplada a espectrometría de masas

Se procede con la inyección de la muestra del aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia* de manera manual en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (modelo Trace 1310, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a su vez se inyecta hidrocarburos (TPH-6RPM de CHEM SERVICIE) desde el decano (C10) hasta el pentacosano (C25). Una vez se presente la corrida cromatográfica obtendremos los índices de retención (Kovats).

Las condiciones que empleadas en la corrida cromatográfica se las observa a continuación:

Tabla 1*Condiciones para operar la columna TR5-MS en GC-MS*

Parámetros	Datos	Condiciones de trabajo
Sistema de inyección	Gas empleado	Helio
	Modo	Split
Horno	Temperatura inicial (°C)	230
	Radio de partición	40:1
	Presión (psi)	11.02
	Temperatura inicial (°C)	50
	Tiempo inicial (min)	3
	Temperatura final (°C)	230
	Rampa (°C/min)	3
Columna	Tipo	TR5-MS
	Modo	Flujo constante
	Temperatura máxima (°C)	350
	Flujo inicial (mL/min)	0.9
	Presión inicial nominal (psi)	11.02
	Velocidad promedio (cm/s)	23
	Presión de salida (atm)	1
Detector		
Espectrómetro de gases	Temperatura (°C)	250

2.3.3 Corrida cromatográfica en la columna TR-5MS acoplada al detector de ionización de llama

En este proceso se usó la columna TR-5MS la cual empleo diferentes condiciones de operación del cromatógrafo de gases mismas que se presentan en la Tabla 2. Se debe tener en cuenta que utilizamos el mismo proceso para la inyección de las muestras en el detector de ionización de llama (FID), en el cual se incluyen los hidrocarburos TPH-6RPM de CHEM SERVICIE que los utilizamos como estándares para la corrida cromatográfica.

Tabla 2

Condiciones para operar la columna TR5-MS en GC-FID

	Parámetro	Valor
	Gas Usado	Helio
Sistema de Inyección	Modo	Split
	Temperatura Inicial	230 °C
	Radio de partición	40:1
	Presión	11.02 psi
Horno	Temperatura Inicial	50 °C
	Tiempo inicial	3 min
	Temperatura final	230 °C
	Rampa	3 °C/min
Columna	Tipo	TR5-MS
	Modo	Flujo constante
	Temperatura máxima	350 °C
	Flujo inicial	0.9 ml/min
	Presión inicial nominal	11.02 psi
	Velocidad promedio	23 cm/seg
	Presión de salida	Ambiente
Detector	Tipo de llama	Aire-Hidrógeno
	Temperatura	250 °C

2.4 Determinación de la actividad antimicrobiana

Para la determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Citrus x limonia* se han empleado las siguientes cepas bacterianas:

Bacterias Gram – Negativas:

- *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028)

- *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 10145)
- *Escherichia coli* (ATCC 43888)
- *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560)

Bacterias Gram – Positivas:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433)
- *Enterococcus faecium* (ATCC 27270)
- *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115)

El método utilizado para determinar la actividad antimicrobiana fue la de microdilución en caldo, la cual nos permitirá determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Esta técnica consiste en utilizar volúmenes pequeños de la muestra, que serán puestos sobre una microplaca de 96 pocillos.

Primeramente, debemos preparar la muestra la cual debe ser diluida, para eso se colocan 40µL del aceite esencial + 460µL de dimetilsulfóxido (DMSO) mismo proceso que se repetirá para todas las bacterias que vayamos a utilizar.

Una vez preparada la disolución de la muestra, procedemos a preparar los medios de cultivo específicos para cada cepa microbiana, para lo cual necesitaremos 30µL de cada medio de cultivo los cuales serán incubados de 14 a 16 horas a condiciones óptimas de crecimiento. En la siguiente tabla se pueden observar las condiciones óptimas de crecimiento de cada cepa bacteriana:

Tabla 3

Condiciones de crecimiento óptimas para las cepas bacterianas

Bacterias	Medio de Cultivo	Temperatura	Tiempo (h)
<i>Escherichia coli</i>	Caldo triptisoya	37 °C	16 - 24
<i>Campylobacter jejuni</i>	Caldo tioglicolato	37 °C	48
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caldo triptisoya	37 °C	16 – 24
<i>Salmonella thypimurium</i>	Caldo nutritivo Oxoid	37 °C	16 – 24
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo triptisoya	37 °C	16 – 24
<i>Enterococcus faecalis</i>	Caldo infusión cerebro corazón	37 °C	16 – 24
<i>Enterococcus faecium</i>	Caldo infusión cerebro corazón	37 °C	16 – 24
<i>Listeria monocytogenes</i>	Caldo nutritivo Oxoid	37 °C	16 – 24

Nota. Tabla de condiciones del crecimiento bacteriano.

El análisis bacteriano se lo realizó en microplacas de 96 pocillos en el cual se empleó la técnica de dilución doble seriada, misma que consiste en transferir 200µL de caldo Mueller Hinton en cada pocillo correspondiente a la primera fila de la microplaca, seguidamente colocamos 100µL en los pocillos restantes para finalmente adicionar 80µL del aceite esencial diluido en los pocillos de la primera fila a excepción de los 3 últimos pocillos ya que en estos se encuentran los controles positivo, negativo y el control de esterilidad.

Una vez culminada la preparación de la placa de microdilución se procede a inocular con 20µL de la suspensión que contiene la cepa bacteriana en los pocillos de la microplaca hasta completar un volumen de 200µL y ajustando la población bacteriana en a $5 \cdot 10^5$ ufc/ml.

Tabla 4

Condiciones óptimas de crecimiento para hongos y levaduras

Hongos y Levaduras	Medio de Cultivo	Temperatura	Tiempo (h)
<i>Candida albicans</i>	Caldo sabouraud	35 °C	16 - 24

Nota. Tabla de condiciones del crecimiento fúngico.

Para la determinación de la actividad antifúngica se utilizó el método de micro dilución en caldo en donde se diluye una reserva de esporas de hongos el cual se diluye en 7ml de caldo sabouraud y se almacena a temperatura de 4 °C para el respectivo análisis de la cepa bacteriana de *Candida albicans*, mientras que para la cepa de *Aspergillus niger* se realiza por método directo de esporas y la lectura del CMI se presenta durante el lapso de tiempo de 48 y 72 horas una vez realizado el análisis.

2.5 Determinación de la actividad antioxidante

Para la respectiva determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Citrus x limonia* se ocuparon dos tipos de métodos espectrofotométricos que se los realizaron en microplacas, DPPH fue el primer método en el que aplicamos la metodología de Ellman al cual se le realizo algunas modificaciones, y el segundo método ocupado fue el ABTS.

2.5.1 Método DPPH

El método DPPH consiste en eliminar radicales basándonos en la técnica determinada por Thaipong a la que se le realizo algunas modificaciones, en esta técnica se empleó el uso de 2,2-difenil-1-picrilhidrido (DPPH). Para la ejecución de la técnica primeramente debemos realizar la solución de trabajo la cual consiste en disolver 24 mg de DPPH en 100 mL de metanol, para poder lograr la estabilización de esta solución debemos colocar en un lector de microplaca EPOCH 2 (BIOTEK, Winooski, VT, USA) para realizar la

absorbancia misma que la debemos establecer en valores de 1.1 ± 0.01 en una longitud de onda de 515 nm.

Se debe realizar la mezcla del aceite esencial con el DPPH misma que se realiza en base a diferentes concentraciones del aceite esencial (1.05 – 0.25 mg/mL). Seguidamente colocamos en una microplaca de 96 pocillos, 270 μ L de DPPH ajustándolo con la solución de trabajo más 30 μ L del aceite esencial. Esta reacción debe ser monitoreada a 515 nm durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Para preparar el control positivo se empleó Trolox y para el blanco se utiliza metanol respectivamente. Los resultados se los obtendrá de acuerdo con la concentración del barrido radical al 50% (SC₅₀), y ajustando la curva realizada en GraphPadPrism v-8.0.1. Cada ensayo se lo realizo por triplicado.

2.5.2 Método ABTS

El método ABTS consiste en la oxidación frente al catión ABTS⁺ (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-ácido sulfónico), basándonos en la técnica descrita por Arnao y Thaipong, con algunas modificaciones.

Para la ejecución de este ensayo se debe realizar una solución madre del radical a fin de obtener volúmenes iguales de ABTS con una concentración 7.4 μ M, con persulfato de potasio a 2.6 μ M, durante 12 horas con una agitación constante.

Para la preparación de las soluciones estándar, utilizamos una disolución de metanol misma que debe ser colocada en el equipo lector de microplacas EPOCH 2 (BIOTEK, Winooski, VT, USA) a 734nm, hasta obtener una absorbancia 1.1 ± 0.02 .

La reacción obtenida se coloca en las placas en cantidades de 270 μ L de la solución ABTS más 30 μ L del aceite esencial de *Citrus x limonia* a diferentes concentraciones (1.05 a 0.25 mg/mL) durante el lapso de 1 hora. Utilizaremos como control positivo a Trolox y metanol como un blanco, los resultados que obtenemos se los expresa en SC50 (concentración de barrido radical 50%) y se calcula con el ajuste de curva de datos con el software GraphPadPrism v.8.0.1.

2.6 Determinación de la actividad acetilcolinesterasa

Para realizar este ensayo empleamos espectrofotometría basándonos en la técnica de Ellman con algunas modificaciones del autor Rhee, para lo cual debemos realizar una solución a partir de 40µL del Buffer Tris, más 20 µL del aceite esencial de *Citrus x limonia*, y 20 µL de acetilcolina (ATCh 15 mM, PBS pH 7.4), y con 100 µL de DTNB (3mM del Buffer Tris).

Seguidamente procedemos con la preincubación de la muestra durante 3 minutos a una temperatura de 25°C con una agitación continua, finalmente colocamos 20µL de 0.5 U/mL AChE. Una vez comenzada la reacción se debe monitorear con el equipo lector de microplacas EPOCH 2 (BIOTEK1) a una longitud de onda de 405 nm a 25 °C durante 60 min.

Se disuelven 10 mg de aceite esencial de *Citrus x limonia* en 1 mL de MeOH, en esta solución se realizaron dos diluciones más para la obtención de concentraciones 10, 100 y 1000 µg/mL. Los ensayos se realizaron a concentración máxima de 250 µM, A través de los estándares DTNB y L-GSH podemos determinar las curvas de absorbancia a diferentes concentraciones para poder medir la velocidad inicial, la cual se expresa en mM/min.

Para calcular el IC₅₀ se lo realiza mediante la regresión lineal del equipo PRISM 8.0.1, GraphPad, San Diego, CA, EE. UU. El disolvente que se emplea es el MeOH el cual nos ayudara a disolver las muestras, para preparar el control negativo utilizamos una concentración máxima del 10% del volumen final de la mezcla sin tomar en cuenta la reacción enzimática, para la elaboración del control positivo se utilizó clorhidrato de donepezilo con valor 12.40 ± 1.35 nM de IC₅₀.

Capítulo tres

Resultados y discusión

3.1 Adquisición de la muestra de aceite esencial

El aceite esencial de *Citrus x limonia* se presentó de color amarillo y con una fase oleosa a temperatura ambiente, el aceite esencial obtenido fue colocado en envases de color ámbar con el fin de que la luz no pueda actuar sobre nuestra muestra.

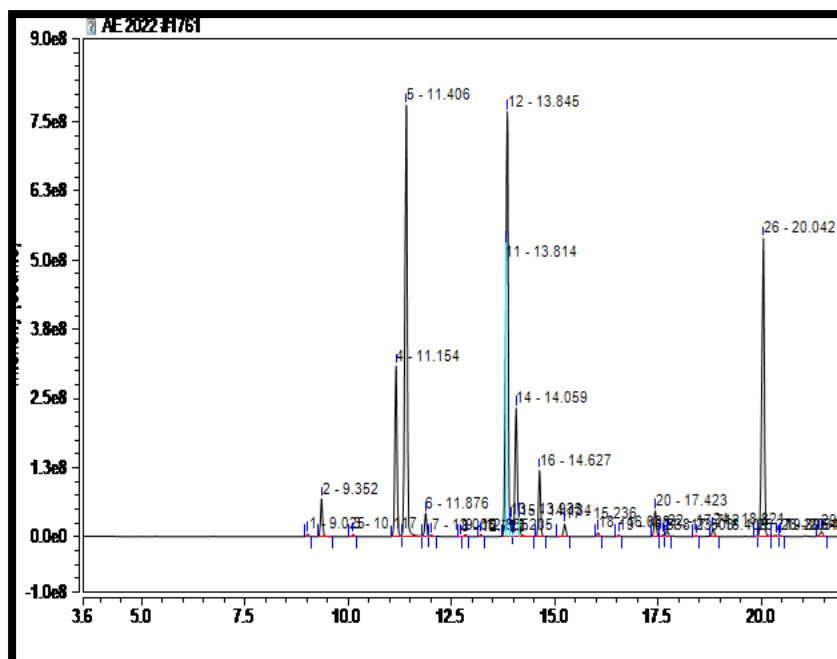
3.2 Composición química del aceite esencial de *Citrus x limonia*

La composición química se la realizó mediante un análisis cromatográfico de gases (GC-MS) en la columna TR5-MS y al detector de ionización de llama (GC-FID), mismo que se puede evidenciar en el siguiente cromatograma

Figura 7

Cromatograma de la columna TR5-MS del aceite esencial de las hojas

de Citrus x limonia



Nota. Eje de las “y” representa la abundancia relativa, el eje de las “x” representa el tiempo de retención (min)

Como podemos observar en la figura 6, el cromatograma del AE de las hojas de *Citrus x limonia* nos indica el tiempo de retención y la abundancia que presenta nuestra muestra, al igual que se puede observar algunos espectros que representan el perfil cromatográfico de varios compuestos entre ellos los mayoritarios que están representados por los picos más elevados.

Para ejecutar el análisis cualitativo de los componentes de nuestro aceite esencial, primeramente, debemos comparar los índices de retención obtenidos en la parte experimental con los calculados, con el fin de poder comparar los espectros de cada compuesto con su respectiva bibliografía del software "MSD-Chemstation D.01.00.Sp1" en conjunto con el texto de "Identification of essential oil components by gas Chromatography/Mass spectrometry" (Adams, 2017).

En la Tabla 4, se presentarán los resultados de la columna TR5-MS, en la cual se menciona la composición química del AE de las hojas de *Citrus x limonia* mismos que están presentes en función del orden de elución de la columna TR5-MS.

Cabe recalcar que también se mencionan los IR^{cal} calculados y los reportados en comparación bibliográfica IR^{ref} , tiempo de retención, la abundancia relativa y la desviación estándar de cada muestra que se inyectó en el cromatógrafo.

Tabla 5

Composición química del AE de las hojas de *Citrus x limonia*.

Nro.	RT	Compuestos	IR ^{Cal}	IR ^{Ref}	Abundancia relativa	DS	FM	MM
1	9.022	Thujene < α ->	916	924	0.14	0.01	C ₁₀ H ₁₆	136.23
2	9.352	Pinene < α ->	924	932	1.86	0.20	C ₁₀ H ₁₆	136.23
3	10.120	Camphene	942	946	0.13	0.00	C ₁₀ H ₁₆	136.23
4	11.154	Sabinene	966	969	8.35	0.10	C ₁₀ H ₁₆	136.23
5	11.403	Pinene < β ->	971	974	23.29	0.15	C ₁₀ H ₁₆	136.23
6	11.872	Myrcene	982	988	1.09	0.07	C ₁₀ H ₁₆	136.23
7	12.835	Octanal < n ->	1003	998	0.11	0.01	C ₈ H ₁₆ O	128.21
8	13.205	Terpinene < α ->	1011	1014	0.08	0.06	C ₁₀ H ₁₆	136.23
9	13.851	Limonene	1024	1024	24.63	0.71	C ₁₀ H ₁₆	136.23
10	13.933	Phellandrene < α ->	1026	1025	0.53	0.37	C ₁₀ H ₁₆	136.23
11	14.056	Cineole <1,8->	1028	1026	6.03	0.28	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
12	14.623	Ocimene <(Z)- β ->	1040	1032	3.65	0.53	C ₁₀ H ₁₆	136.23
13	15.232	Terpinene < γ ->	1053	1054	0.74	0.03	C ₁₀ H ₁₆	136.23
14	16.038	Sabinene hydrate < <i>cis</i> -> (IPP vs. OH)	1070	1070	0.20	0.00	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
15	16.538	Mentha-2,4(8)-diene <.->	1080	1085	0.26	0.27	C ₁₀ H ₁₆	136.23
16	17.416	Linalool	1098	1095	1.25	0.03	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
17	17.708	Nonanal < n ->	1104	1100	0.41	0.20	C ₉ H ₁₈ O	142.24
18	18.820	Menthatriene <1,3,8- ρ ->	1127	1108	0.39	0.16	C ₁₀ H ₁₄	134.22
19	20.035	Citronellal	1152	1148	15.91	0.76	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
20	20.456	Isocitral <(Z)->	1161	1160	0.66	0.85	C ₁₀ H ₁₆ O	152.23
21	21.446	Terpinen-4-ol	1181	1181	0.30	0.18	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
22	22.232	Terpineol < α ->	1198	1186	1.24	0.82	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
23	22.585	Decanal < n ->	1206	1201	0.17	0.09	C ₁₀ H ₂₀ O	156.26
24	23.609	Citronellol	1228	1223	0.79	0.34	C ₁₀ H ₂₀ O	156.26
25	24.259	Neral	1241	1235	0.53	0.40	C ₁₀ H ₁₆ O	152.23
26	25.660	Geranial	1271	1264	0.96	0.01	C ₁₀ H ₁₆ O	152.23
27	27.282	Undecanal	1307	1305	0.17	0.06	C ₁₁ H ₂₂ O	170.29
28	29.030	Citronellyl acetate	1346	1352	0.62	0.49	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	198.30
29	29.473	Neryl acetate	1356	1359	0.27	0.08	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196.29
30	30.357	Geranyl acetate	1376	1379	0.68	0.88	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196.29
31	32.047	Caryophyllene <(E)->	1416	1417	0.73	0.47	C ₁₅ H ₂₄	204.35
32	33.615	Humulene < α ->	1453	1452	0.39	0.49	C ₁₅ H ₂₄	204.35
33	34.697	Germacrene D	1478	1480	0.33	0.36	C ₁₅ H ₂₄	204.35

34	35.520	Farnesene <(E,E)- α -> < α ->	1498	1505	0.99	0.03	C ₁₅ H ₂₄	204.35
35	36.203	Cadinene < δ ->	1515	1522	0.10	0.06	C ₁₅ H ₂₄	204.35
36	37.928	Nerolidol <(E)->	1559	1531	0.38	0.44	C ₁₅ H ₂₆ O	222.37
*TOTAL IDENTIFICADO (%) =					98.33			

Nota: **IR^{Cal}**: índice de retención calculado; **IR^{Ref}**: índice de retención de referencia;

DS: desviación estándar, **FM**: formula molecular, **MM**: masa molecular

Estudios realizados por Urrunaga-Ormachea et al., (2022) determinaron la composición química del aceite esencial de *Citrus jambhiri* (limón rugoso) en los que se evidencio una composición química similar a la de nuestra especie en donde los compuestos mayoritarios fueron el limonene (37.7%), Pinene < β -> (25.1%) y citronelal (4.9%).

Otros estudios realizados por Miller et al., (2012) destacan al limonene como un monoterpeno con alto potencial terapéutico mismo que ha sido utilizado para realizar estudios preclínicos de cáncer de mama esto con el fin de buscar una dosificación alternativa como la administración tópica.

Para el estudio de dosificación alternativa se utilizó una línea de ratones (SKH-1) y el aceite esencial de naranja en donde se demostró que la disposición de la administración tópica y oral en los ratones es similar en el tejido mamario sin presentar signos de toxicidad.

La conclusión de este estudio fue que el limonene presenta una biodisponibilidad optima a la hora de ser aplicado por vía tópica el aceite esencial de naranja en el tejido mamario de los ratones, demostrando que esta nueva vía de administración en el seno es segura y sin riesgo de toxicidad en mujeres sanas (Miller et al., 2012).

3.3 Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus x limonia*.

En la Tabla 6, se reportan los resultados obtenidos de los análisis ejecutados a la actividad antimicrobiana que se realizó a las diferentes cepas bacterianas de nuestro interés.

Tabla 6

Resultados de la actividad antimicrobiana del AE de *Citrus x limonia*

Cepas Bacterianas	AE <i>Citrus x</i>	Control Positivo	Control Negativo
	<i>limonia</i>	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	
Gram-Positive Cocos			
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	1000	0.7812	+
<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 27270)	4000	<0.3906	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	-	<0.3906	+
Gram-positivo bacilo			
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19115)	1000	1.5625	+
Gram-negativo bacilo			
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 43888)	4000	1.5625	+
<i>Campylobacter jejuni</i> (ATCC 33560)	2000	1.5625	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	-	<0.3906	+
<i>Salmonella Thypimurium</i> (ATCC 14028)	-	<0.3906	+

Nota. Crecimiento normal

Se utilizó el método de microdilución en caldo el cual nos ha ayudado con la determinación de las actividades antibacterianas del AE de las hojas de *Citrus x limonia*. En la Tabla 5 se puede evidencia los microorganismos a los cuales se les realizo este ensayo y a su vez nos muestra los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI), control positivo y control negativo.

Para las cepas bacterianas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus* se utilizó Ampicilina como control positivo y para las cepas bacterianas de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella Thypimurium* ocupamos Ciprofloxacina para el control positivo.

Como control negativo se ocupó dimetilsulfóxido al 5% que se aplica a todas las cepas bacterianas mencionadas anteriormente. El aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia* reporta valores CMI de 1000 µg/mL contra *Enterococcus faecalis*, CMI de 4000 µg/mL contra *Enterococcus faecium* y para *Staphylococcus aureus* no se pudo determinar la CMI en la máxima concentración testada (4000 µg/mL).

Los autores Van Vaureen S. & Holl D., (2017) nos mencionan los valores de referencia en una escala del CMI que nos ayudara a reconocer la eficacia de nuestro aceite esencial, los autores proponen que los aceites esenciales con valores de CMI > 1000 µg/mL se consideran inactivos, una CMI entre 500 y 1000 µg/mL tienen una actividad moderada, una CMI de 101 y 500 µg/mL presentan una actividad fuerte y si presentan una CMI < 100 µg/mL tendrán una actividad muy fuerte.

Tomando en cuenta esta escala podemos determinar que el aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia* muestra una actividad moderada contra las cepas de *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes* (1000 µg/mL), contra las cepas de *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* (4000 µg/mL) y *Campylobacter jejuni* (2000 µg/mL) presenta una actividad inactiva, las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella Thypimurium* no presentan una actividad antibacteriana ya que no se pudo determinar el CMI a la máxima concentración testada (4000 µg/mL). Así mismo, se evidencio que los controles positivos aplicados presentan un CMI de 1 g/mL en el caso de la Ampicilina y 1 mg/mL en el caso de Ciprofloxacina por lo que las consideramos como sustancias sintéticas puras por otro lado el AE de las hojas de *Citrus x limonia* lo consideramos como una mezcla de compuestos naturales presentes en esta especie.

En base a estos resultados podemos decir que el aceite de las hojas de *Citrus x limonia* presenta una actividad antibacteriana moderada en dos de las ocho cepas bacterianas testeadas.

Se ha determinado a través de estudios que la especie de *Citrus limón* perteneciente a la misma familia de *Citrus x limonia* ha sido testada al 75% y 100% sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556) con el fin de evidenciar el potencial de la actividad antibacteriana que este aceite esencial presenta.

Estudios realizados por Romero (2020), menciona que a través de los resultados obtenidos en su investigación ha podido demostrar que las concentraciones utilizadas en las cepas bacterianas son más susceptibles a la concentración del 100% ya que se obtuvo un mayor halo de inhibición, esto a causa de que el aceite esencial de *Citrus limón* penetra las membranas bacterianas causando el deceso de la bacteria.

La naturaleza fenólica que presenta el aceite esencial de *Citrus limón* es uno de los factores que provocan la respuesta antimicrobiana frente a este tipo de cepas bacterianas ya que los compuestos fenólicos presentes en el AE causan la muerte celular (Romero, 2020).

3.4 Actividad antifúngica del aceite esencial de *Citrus x limonia*

En la Tabla 7, se reportan los resultados de los análisis realizados para determinar la actividad antifúngica en cepas de Hongos y Levaduras

Tabla 7

Resultados de la actividad antifúngica del AE de *Citrus x limonia*

Cepas Bacterianas	AE <i>Citrus x</i>	Control Positivo	Control Negativo
	<i>limonia</i>	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	
Hongos y Levaduras			
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	250	<0.098	+
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 6275)	500	<0.098	+

Tomando en cuenta la misma escala de los autores Van Vaureen & Holl (2017), podemos deducir que el aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia* presenta una actividad antifúngica fuerte en ambas cepas ya que *Candida albicans* presenta un CMI de (250 $\mu\text{g/mL}$) y *Aspergillus niger* un CMI de (500 $\mu\text{g/mL}$). El control positivo utilizado en este ensayo fue un antifúngico sintético Anfotericina B con un CMI de 250 $\mu\text{g/mL}$.

Estudios realizados por Rodríguez-Rodríguez et al., (2017) en cepas de *Aspergillus niger* presenta una actividad antifúngica muy favorable al usar aceite esencial de la cascara de *Citrus x limonia* en una fracción de diclorometano (CLD) en el cual se evidencio una inhibición del micelio y esporulación de manera dependiente a concentraciones de 5 y 7 mg/mL. La cepa de *A.niger* presento varios cambios de los cuales se pudo evidenciar la disminución del tamaño y color de la cepa bacteriana.

3.5 Actividad antioxidante del aceite esencial *Citrus x limonia*

Los resultados de la actividad antioxidante del AE de *Citrus x limonia* se exhibe en la Tabla 8 en función a la metodología que emplea (López et al., 2002).

Tabla 8

Resultados de los ensayos del método ABTS y DPPH

Muestra	ABTS	TEAC	DPPH
	SC ₅₀ (µg/mL—µM *) ± SD		
<i>AE Citrus x limonia</i> (hojas)	9115.15 ± 2.13	4.69 ± 0.04	-
Trolox *	29.09 ± 1.05		35.53 ± 1.04

Nota. SD: desviación estándar, n=9

La actividad antioxidante se estableció con el SC₅₀, de tal manera que para el método ABTS presento una actividad baja (9115.15 ± 2.13) en comparación con la bibliografía al igual que el método DPPH que no presento actividad a la máxima capacidad testada.

Estudios realizados en ratones por Abdel Daim et al., (2020) demuestran una alta capacidad de efectos antiinflamatorios y antioxidantes. Así mismo evaluaron los efectos protectores del AE de *Citrus x limonia* contra la nefrotoxicidad inducida por cisplatino en los cuales pudieron determinar que el AE de *Citrus x limonia* puede mejorar el efecto toxico del cisplatino en los riñones de los ratones esto gracias a los efectos antioxidantes que presenta el AE.

Otros estudios realizados en la especie de *Citrus aurantium* indican la presencia de flavononas en el aceite esencial de esta especie, las cuales han demostrado tener una potente actividad antioxidante, ya que son secuestradores de radicales libre que contribuyen a la acción anticancerígena, cardioprotectora entre otras (Chamba et al., 2022).

3.6 Actividad acetilcolinesterasa del aceite esencial de *Citrus x limonia*

Los resultados que se obtuvieron frente a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa del aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia* se presentan en la Tabla 9:

Tabla 9

Resultados de los ensayos de la actividad acetilcolinesterasa

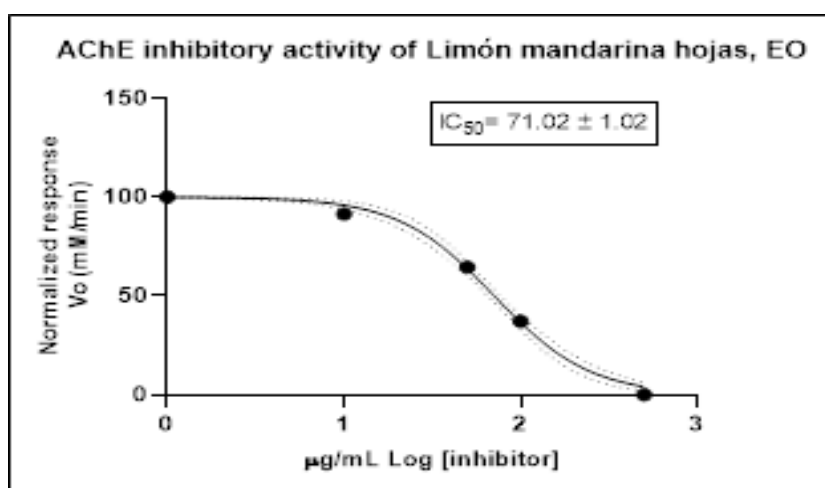
Muestra	Acetilcolinesterasa
	IC ₅₀ (µg/mL - nM *) ± SD
<i>Citrus x limonia</i> (hojas)	71.02 ± 1.02
Donepezilo *	12,40 ± 1,35†

La actividad acetilcolinesterasa se la determino a través de un método colorimétrico guiándose de la metodología aplicada por los autores Andrade JM et al., (2022), nos mencionan que la inhibición de la AChE se midió utilizando el método colorimétrico desarrollado por Ellman con algunas modificaciones sugeridas por Rhee.

Los resultados que se obtuvieron realizando la medición de reacción de AChE contra EO se muestran en la Figura 8.

Figura 8

Concentración IC₅₀ del aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia*



Los resultados de la concentración de aceite esencial están representados como Log frente a la respuesta normalizada de la reacción la cual nos permite calcular el valor de IC₅₀. El valor de IC₅₀ que se obtuvo para el aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia*

fue de $71.02 \pm 1.02 \mu\text{g/mL}$. Utilizamos donepezilo como control positivo el cual presenta un valor IC_{50} 12.40 ± 1.35

Por tanto, se considera que el valor de la IC_{50} presentado por el AE de las hojas de *Citrus x limonia* presenta una potencia moderada según los valores de referencia que nos da (López et al., 2002) la cual menciona una alta potencia, $IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$; potencia moderada, $IC_{50} < 200$; y baja potencia $IC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$.

Estudios realizados por Zarrad et al., (2015) para determinar la actividad anticolinesterasa del AE de *Citrus aurantium* con el fin de usarlo como fumigante contra la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Los investigadores tenían el antecedente que el AE de *Citrus aurantium* y su compuesto mayoritario el limonene (85.523%) tenían una potente inhibición de AChE (IC_{50} de 2,94 mM y 3,54 mM) los cuales presentaban una inhibición no competitiva reversible lo que se tomaba como positivo ya que los componentes del aceite podrían unirse a la enzima sola o al sustrato enzimático.

El aceite esencial de *Citrus aurantium* utilizado como fumigante tiene una tasa de mortalidad elevada contra *B. tabaci* dependiendo de la concentración del AE que se aplique como fumigante.

Conclusiones

El aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia* presento 36 compuestos identificados que representan el 94,72% del total de la muestra.

Los compuestos mayoritarios que se pudieron identificar del aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia* fueron: limonene (24.63%), pinene < β -> (23.29%), citronellal (15.91%), sabinene (8.35%) y Cineole <1,8-> (6.03%).

Se pudo constatar que el aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia* presento una actividad antibacteriana moderada en cepas bacterianas de *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes* con un CMI de 1000 $\mu\text{g/mL}$ a diferencia de las otras cepas bacterias en las que el aceite esencial que no presentan esta actividad porque no se pudo evidenciar el CMI a la máxima capacidad testeada.

La actividad antifúngica se presentó de manera fuerte en las dos cepas estudiadas para *Candida albicans* (CMI 250 $\mu\text{g/mL}$) y *Aspergillus niger* (CMI 500 $\mu\text{g/mL}$).

La actividad antioxidante se presentó muy baja para el método ABTS en el cual se pudo evidenciar una SC_{50} (9115.15 \pm 2.13) y para el método DPPH no se establece su SC_{50} ya que no se lo pudo evidenciar en la máxima capacidad testeada

En la actividad acetilcolinesterasa se pudo constatar que el AE de las hojas de *Citrus x limonia* presento una actividad moderada con respecto a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa la cual presento un IC_{50} que fue de 71.02 \pm 1.02 $\mu\text{g/mL}$.

Recomendaciones

Con respecto a los resultados que hemos obtenido en los diferentes ensayos realizados podemos recomendar continuar con las investigaciones pertinentes con el fin de aprovechar la presencia de actividad antibacteriana, anticolinesterasa, antifúngica de nuestro aceite esencial en la elaboración de productos naturales para tratar malestares o enfermedades.

Aumentar la capacidad máxima de testeo para la obtención de CMI de nuevas bacterias de estudio.

Aprovechar la actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Citrus x limonia* ya que presento una actividad fuerte misma que puede aplicarse a diversos productos para el tratamiento de hongos.

Referencias

- Abdel-Daim, M. M., Mahmoud, O. M., Al Badawi, M. H., Alghamdi, J., Alkahtani, S., & Salem, N. A. (2020). Protective effects of Citrus limonia oil against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(33), 41540–41550. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-10066-X>
- Adams, R. (2017). *IDENTIFICATION OF ESSENTIAL OIL COMPONENTS BY GAS CHROMATOGRAPHY/ MASS SPECTROMETRY* (41st ed.).
- Andrango, R., & Fernando, P. (2021). *Determinación de la capacidad antioxidante del zumo de la especie cítrica híbrida limón-mandarina "Citrus x limonia" durante su tiempo de vida útil*. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/22545>
- Arredondo, J., Echeguren, A., Arzate, P., & Medina, J. (2018). Susceptibilidad antimicrobiana de Enterococcus faecalis y faecium en un hospital de tercer nivel. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 31, 56–61. <https://www.medigraphic.com/pdfs/infectologia/lip-2018/lip182d.pdf>
- Bafna, A., & Mishra, s. H. (2005). In vitro antioxidant activity of methanol extract of rhizomes of Curculigo orchioides Gaertn. *Ars Pharmaceutica*, 46, 125–138.
- Bandwolf, A. S. (2003). INTRODUCCION A LA INDUSTRIA DE LOS ACIETES ESENCIALES EXTRAIDOS DE LAS PLANTAS MEDICINALES Y AROMATICAS. SENA, 40. https://repositorio.sena.edu.co/sitios/introduccion_industria_aceites_esenciales_plantas_medicinales_aromaticas/#
- Barrera, L., & García, L. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de Fusarium sp. aislado de papaya (Carica papaya) . *UDO Agrícola*, 1(2008), 33–41. <http://www.bioline.org.br/pdf?cg08005>
- Bush, L. (2022, April). *Introducción a las bacterias gram negativas - Infecciones - Manual MSD versión para público general*. Schmidt College of Medicine.

<https://www.msdmanuals.com/es/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-gramnegativas/introducci%C3%B3n-a-las-bacterias-gram-negativas>

Carretero, M. (2003). Los inhibidores de la acetilcolinesterasa en el tratamiento del Alzheimer. *Offarm*, 22(7), 114–115. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-inhibidores-acetilcolinesterasa-el-tratamiento-13050017>

Castro Morales, N. del R., Flores Chin, S. J., Guzmán García, A. A., Cantor García, J. J., Velásquez López, F. Z., & Leiva Navarro, M. R. (n.d.). *Situación actual en el limón mandarina (Citrus x limonia) en el departamento de Suchitepéquez: Una alternativa en la diversificación agrícola.*

Cetino, R. (2023, October). *Árbol paraguayo o «citrus limonia» que crece en Guatemala | Aprende Guatemala.com.* <https://aprende.guatemala.com/cultura-guatemalteca/flora-fauna/arbol-paraguayo-o-citrus-limonia-que-crece-en-guatemala/>

Chamba, W., Petroche, D., Cortez, L., & Mariscal, W. (2022). Tamizaje fitoquímico, fenoles totales y actividad antioxidante de citrus aurantium. *RECIAMUC*, 470–479. <https://reciamuc.com/index.php/RECIAMUC/article/view/929/1348>

Granda, F. (2018). *Listeria monocytogenes: transmisión, formas y tratamientos efectivos. ELSEVIER.* <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/listeria-monocytogenes-listeriosis-transmision-tratamiento>

Jørgensen, M. G., van Raaphorst, R., & Veening, J. W. (2013). Noise and Stochasticity in Gene Expression: A Pathogenic Fate Determinant. *Methods in Microbiology*, 40, 157–175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417029-2.00006-6>

Kemper, L., & Hensel, A. (2023). Campylobacter jejuni: targeting host cells, adhesion, invasion, and survival. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2023 107:9, 107(9), 2725–2754. <https://doi.org/10.1007/S00253-023-12456-W>

López Luegon, M. T. (2004). Los aceites esenciales. *Offarm*, 23(7), 88–91. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-aceites-esenciales-13064296>

- López, S., Bastida, J., Viladomat, F., & Codina, C. (2002). Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. *Life Sciences*, 71(21), 2521–2529. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02034-9](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02034-9)
- Martínez, A. (2001). *UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA ACEITES ESENCIALES*. 1.
- Miller, J. A., Thompson, P. A., Hakim, I. A., Lopez, A. M., Thomson, C. A., Chew, W., Hsu, C.-H., & Chow, H.-H. S. (2012). Safety and Feasibility of Topical Application of Limonene as a Massage Oil to the Breast. *Journal of Cancer Therapy*, 3(5A), 749–754. <https://doi.org/10.4236/JCT.2012.325094>
- Muñoz, F., & Navarro, C. (2011). *CXVIII. RUTACEAE*. 2.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (n.d.). *Células Eucariotas y Procariotas: Clasificación y Estructura (Murray, 9ª edición)*. Retrieved December 5, 2023, from <https://www.elsevier.com/es-es/connect/clasificacion-estructura-y-replicacion-de-las-bacterias>
- Pardi, G., Guilarte, C., Cardozo, E. I., & Briceño, E. N. (2009). “Detección de enterococcus faecalis en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico.” *Acta Odontológica Venezolana*, 47(1), 110–121. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652009000100014&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., Vázquez-López, R., Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>
- Prusty, J. S. (2022). Antifungal discovery from plant sources. *Phytoconstituents and Antifungals*, 15–33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91792-6.00007-8>

- Rioja, A., Vizaluque, B., Aliaga, E., Tejeda, L., Book, O., Mollinedo, P., & Peñarrieta, M. (2018). DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL, FENOLES TOTALES, Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UNA BEBIDA NO LÁCTEA EN BASE A GRANOS DE CHENOPODIUM QUINOA. *Revista Boliviana de Química*, 32(5), 168–176. <https://doi.org/10.1111/JFPP.12944>
- Rodríguez-Rodríguez, L. D., Jiménez-Rodríguez, Á. A., Murillo-Arango, W., Rueda-Lorza, E. A., & Méndez-Arteaga, J. J. (2017). Actividad antimicrobiana de cáscaras y semillas de Citrus limonia y Citrus sinensis. *Actualidades Biológicas*, 39(106), 53–59. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v39n106a05>
- Romero, Y. (2020). EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE Citrus Limon (LIMÓN) Al 75% y 100% SOBRE CEPAS DE Streptococcus mutans ATCC 25175 Y Streptococcus sanguis ATCC 10556.
- Ruiz, M. (2020, August). DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE. Universidad Simón Bolívar. <https://bonga.unisimon.edu.co/bitstream/handle/20.500.12442/7986/Gu%C3%ADa%20de%20Determinaci%C3%B3n%20de%20la%20actividad%20antioxidante.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Taylor, T., & Unakal, C. (2022). Staphylococcus aureus Infection. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 555–584. <https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch21>
- Urrunaga-Ormachea, M., del Carpio-Jiménez, C., Gutierrez-Chavez, R. G., Tomaylla-Cruz, C., Urrunaga-Ormachea, M., del Carpio-Jiménez, C., Gutierrez-Chavez, R. G., & Tomaylla-Cruz, C. (2022). Propiedades fisicoquímicas, composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de Citrus jambhiri (Limón rugoso). *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 88(3), 277–288. <https://doi.org/10.37761/RSQP.V88I3.403>
- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena. *Salud Pública de México*, 49(5), 376–386.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342007000500008&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Zarrad, K., Ben Hamouda, A., Chaieb, I., Laarif, A., & Mediouni-Ben Jemâa, J. (2015). Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian *Citrus aurantium* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 76, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.039>