



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“DR. ALFREDO NICOLÁS USUBILLAGA DEL
HIERRO”**



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL
DE LA ESPECIE *Citrus sinensis* L.**

www.bdigital.ula.ve

**Autora:
Cubillan Márquez Paola
Andreina
CI: V-23.560.297
Tutora:
Prof. Diolimar Buitrago**

Mérida, Octubre 2021



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“DR. ALFREDO NICOLÁS USUBILLAGA DEL
HIERRO”**



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE *Citrus sinensis* L.**

(Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Licenciada en
Bioanálisis)

www.bdigital.ula.ve

Autora:
Cubillan Márquez Paola
Andreina
CI: V-23.560.297
Tutora:
Prof. Diolimar Buitrago

Mérida, Octubre 2021

DEDICATORIA

A Dios primeramente por haberme permitido la dicha de escoger esta linda carrera y poder realizar y terminar este proyecto de grado.

A mi mamá Ysabel Márquez por haber sido mi pilar, mi columna, mi fortaleza y mi guía a lo largo de mi vida, porque a pesar de ciertas dificultades siempre me ha sabido guiar ha sido mi apoyo incondicional.

A mi papá José Luis Cubillan, a quien le debo eternamente haberme brindado el apoyo tanto emocional como económico y haber luchado a mi lado hasta el final de esta hermosa meta.

A mis familiares hermanos, tías y tíos y primos que han estado presentes a lo largo de estos años y han tenido las palabras adecuadas para que nunca desistiera y siguiera luchando hasta lograrlo, hoy puedo decirles lo he logrado.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTO

A Dios le doy gracias por esta meta cumplida, porque simplemente ha sido mi guía en toda la carrera, ha estado siempre a mi lado.

A mis padres, hermanos y demás familiares, por ser el motor más bello que he tenido para no desistir y siempre luchar.

A mi tutora Profesora Diolimar Buitrago, gracias por la paciencia y la confianza que ha tenido en mí, por haber creído en mí y permitirme ser su tesista. Gracias por esas palabras de aliento que me dio cuando las necesitaba.

Al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” por haberme permitido elaborar en sus laboratorios la parte experimental de mi trabajo de grado.

Al profesor Luis Rojas, quien en vida fue un excelente profesor de calidad, el cual impartía sus conocimientos, brindando confianza, apoyo, consejos, orientación con dedicación y compromiso a todos sus estudiantes.

A la Ilustre Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por abrirme sus puertas y permitirme formarme como profesional gracias a los invaluable conocimientos impartidos de excelentes profesionales como lo son sus profesores.

INDICE GENERAL

	Pág.
VEREDICTO	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
INDICE DE ESQUEMAS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
EL PROBLEMA	3
Planteamiento del Problema	3
Justificación de la Investigación	5
Objetivos de la Investigación	6
Objetivo General	6
Objetivos Específicos	6
Alcance y Limitaciones de la Investigación	7
CAPÍTULO II	8
MARCO TEÓRICO	8
Trabajos Previos	8
Antecedentes Históricos	13
Bases Teóricas	14
Aspectos generales de la familia Rutaceae	14
Descripción botánica	14
Clasificación taxonómica	15
Hábitat y distribución geográfica	16
Género <i>Citrus</i> L.	16
Descripción botánica	16
Especies del género <i>Citrus</i>	17

Componentes volátiles del género <i>Citrus</i> L.	18
Especie <i>Citrus sinensis</i> L.	20
Descripción botánica	20
Origen y distribución	21
Componentes volátiles de la especie <i>Citrus sinensis</i>	21
Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de la especie <i>Citrus sinensis</i> L.	22
Aceites esenciales	23
Terpenoides	24
Compuestos aromáticos	24
Compuestos de orígenes diversos	25
Técnicas de extracción	25
Destilación por Arrastre de Vapor	25
Hidrodestilación	26
Análisis de los componentes	26
Bacterias	28
Morfología microscópica	28
Morfología macroscópica	28
Estructura bacteriana	28
Mecanismo de la tinción de Gram	29
Bacterias Gram positivas	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	30
<i>Enterococcus faecalis</i>	31
Bacterias gramnegativas	31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
<i>Escherichia coli</i>	33
Definición de Términos	33
Operacionalización de las Variables	35
Hipótesis	38

CAPÍTULO III	39
MARCO METODOLÓGICO	39
Tipo de Investigación	39
Diseño de la Investigación	39
Población y Muestra	40
Unidad de Investigación	40
Selección del tamaño de la muestra	40
Sistema de Variables	40
Instrumento de recolección de datos	41
Procedimientos de la Investigación	41
Recolección de la muestra	42
Obtención del aceite esencial	43
Determinación de la composición química del aceite esencial	43
Determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial	44
Método de difusión en agar o Kirby-Baüer	44
Pasos del técnica de difusión en agar o Kirby-Baüer	44
Diseño de Análisis	46
CAPÍTULO IV	47
RESULTADOS Y DISCUSIONES	47
Resultados	47
Discusión	52
CAPÍTULO V	55
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
Conclusiones	55
Recomendaciones	55
ANEXOS	56
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	58

INDICE DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Procedimiento de la investigación	42

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE FIGURAS

	Pág
	.
Figura 1. Hábitat y distribución geográfica de la familia Rutaceae	16
Figura 2. Fruto del naranjo <i>Citrus sinensis</i> L.	20
Figura 3. Hidrodestilación.	26
Figura 4. Principales componentes volátiles encontrados en el aceite esencial de la especie <i>Citrus sinensis</i> L.	49
Figura 5. Componentes mayoritarios del aceite esencial de las hojas de la especie <i>Citrus sinensis</i> L.	49
Figura 6. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de <i>Citrus sinensis</i> L. frente a <i>Enterococcus faecalis</i>	55
Figura 7. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de <i>Citrus sinensis</i> L. frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	55
Figura 8. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de <i>Citrus sinensis</i> L. frente a <i>Escherichia coli</i>	56
Figura 9. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de <i>Citrus sinensis</i> L. frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i>	56
Figura 10. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de <i>Citrus sinensis</i> L. frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57

INDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Clasificación taxonómica de la familia Rutaceae	15
Tabla 2. Especies más cultivadas del género <i>Citrus</i> L.	18
Tabla 3. Algunos componentes volátiles encontrados en especies del género <i>Citrus</i> L.	19
Tabla 4. Clasificación taxonómica de la especie <i>Citrus sinensis</i> L.	21
Tabla 5. Algunos componentes volátiles de la especie <i>Citrus sinensis</i> L.	22
Tabla 6. Operacionalización de la Variable Dependiente	36
Tabla 7. Operacionalización de la Variable Independiente	37
Tabla 8. Antibióticos comerciales utilizados como control positivo en el estudio de la actividad antibacteriana.	45
Tabla 9. Compuestos presentes en el aceite esencial de la especie <i>Citrus sinensis</i> L.	48
Tabla 10. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie <i>Citrus sinensis</i> L.	50



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“DR. ALFREDO NICOLÁS USUBILLAGA DEL
HIERRO”



COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE *Citrus sinensis* L.

Autora: Paola Andreina Cubillan Marquez

Tutora: Prof. Diolimar Buitrago

RESUMEN

Citrus sinensis L. pertenece a la familia de la Rutáceas, género *Citrus*, es considerada una de las frutas más cultivadas en el mundo. Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue determinar la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de la especie *Citrus sinensis* L., en cepas bacterianas de referencia internacional. El aceite esencial se obtuvo a partir de las hojas frescas de la planta, mediante hidrodestilación, con un rendimiento porcentual de 0,14%. Luego se caracterizó la composición química por Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masa (CG-EM), en donde se evidenció que los componentes mayoritarios fueron: β -felandreno (39,50 %), Linalool (10,76 %), Δ -3-careno (9,95 %), Terpineno (5,14 %), Limoneno (4,50 %) y trans-careno (4,50%); siendo los monoterpenos, los encontrados en mayor porcentaje con 90,77 %. En relación a la actividad antibacteriana del aceite esencial puro de las hojas frescas, se determinó mediante la técnica de difusión en agar o método de Kirby-Bauer frente a cinco bacterias: dos grampositivas *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (15 mm) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (15 mm) y tres gramnegativas *Escherichia coli* ATCC 25922 (17 mm), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 (20 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (10 mm), observándose que el aceite esencial inhibió el crecimiento bacteriano de todos los microorganismos ensayados.

Palabras claves: Aceite esencial, *Citrus sinensis* L., actividad antibacteriana.

INTRODUCCION

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define que la medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales. En otro contexto, el conocimiento de las plantas medicinales se extiende a cualquier parte del mundo, donde el hombre tradicionalmente ha necesitado de estos seres para curar sus afecciones (Fuentes y Granda, 1997).

La práctica de la medicina herbaria o tradicional, se basa en el uso terapéutico de las plantas medicinales como sustitutas de las medicinas farmacéuticas o en combinación; de las plantas se usa sus extractos en diversas formas de preparación, para mejorar el estado de salud (White y Foster, 2004).

En algunos países, estos productos se pueden elaborar mediante diversos procedimientos. Estas sustancias contienen como principios activos partes de plantas, materiales vegetales o combinaciones de ambos elementos; su uso, está bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz (Organización Mundial de la Salud, 2020).

A lo largo de la historia, los aceites esenciales han sido utilizados por parte de la medicina tradicional debido a su capacidad antimicrobiana, en el tratamiento de enfermedades infecciosas desde mucho antes del conocimiento de la existencia de los microorganismos (Usano, Palá y Díaz, 2014).

La destacada variabilidad en cuanto a la composición química que presentan los aceites esenciales, se encuentra asociada a una gran multifuncionalidad como consecuencia de la capacidad de interaccionar con receptores específicos de múltiples dianas biológicas; en este sentido, muchos aceites esenciales destacan por ser eficientes insecticidas frente a una amplia gama de insectos, además de poseer actividad antimicrobiana y fitotóxica (Can y Buchbauer, 2015).

Actualmente, se estudian por sus propiedades biológicas como antitumorales, analgésicos, insecticidas, antidiabéticos y antiinflamatorio y por supuesto se amplía la investigación sobre las propiedades antioxidantes, antimicrobianas (Ribeiro, Andrade, Ramos, Regiane, Araújo y Sánchez, 2017; Irkin, y Kizilirmak, 2015). De allí, la necesidad de aportar información útil diversificando y ampliando el espectro de plantas utilizadas con el fin de obtener aceites esenciales, tomando como base aquellas que hacen parte de nuestro entorno. Es por ello que se hace interesante el estudio de la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial *Citrus sinensis* L.

Este proyecto de investigación ha sido sistematizado de la siguiente manera:

El Capítulo I, El Problema, formado por: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones de la Investigación.

El Capítulo II, Marco Teórico, donde se describen los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis.

El Capítulo III, Marco Metodológico, consta de: Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimientos o Metodología de la Investigación y Diseño de Análisis.

Capítulo IV, Resultados y Discusión.

Capítulo V, Conclusiones y Recomendaciones.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La utilización terapéutica de la penicilina y otros antibióticos a partir de los años cuarenta, ha sido uno de los logros más importantes de este siglo. Desde entonces se han obtenido, comercializado y utilizado una gran cantidad de antimicrobianos; y sin embargo, así como al comienzo de la era antibiótica se tenía la falsa esperanza de que las enfermedades producidas por microbios desaparecerían, pronto se puso de manifiesto que las bacterias eran capaces de desarrollar mecanismos de resistencia y así en los años cincuenta ya se conocían cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina (Daza, 1998).

La naturaleza aparentemente perfecta de las sustancias antimicrobianas, que originalmente se aclamaron como “medicamentos maravilla”, se ha ido desgastando por la aparición de cepas resistentes a su acción. Es posible que la resistencia sea inherente al organismo o que aparezca en especies antes susceptibles debido a mutación o adquisición de nuevos genes. Los mecanismos por los cuales las bacterias desarrollan resistencia y cómo se propaga dicha resistencia son de gran interés para continuar utilizando los fármacos actuales y para desarrollar estrategias en la creación de nuevos antimicrobianos (Organización Mundial de la Salud, 2020).

Los mecanismos de resistencias adquiridas y transmisibles, son los más importantes y consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos o en la aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del propio punto diana.

Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos generados por diversas especies bacterianas (Olano, Ochoa, Salirrosas y Vásquez, 2014).

En las últimas décadas, la resistencia de los microorganismos a antibióticos y otros compuestos, abre nuevas vías a la búsqueda de alternativas de control antimicrobiano de origen natural; dentro de ellos, los aceites esenciales tienen un gran potencial. La actividad antibacteriana que poseen estos aceites, se debe a la gran variedad de componentes químicos presentes en ellos. Estos compuestos ejercen un potencial antibacteriano porque interfieren en la membrana que recubre al microorganismo patógeno causando el incremento de su permeabilidad y la pérdida de sus constituyentes celulares. La actividad antibacteriana de los diferentes componentes presentes en los aceites esenciales se conoce como la capacidad inhibitoria frente al crecimiento de microorganismos patógenos (Usano, Palá y Díaz, 2014).

Considerando lo previamente mencionado se ha planteado el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie *Citrus sinensis* L., en cepas bacterianas?

Justificación de la Investigación

Desde tiempos milenarios, existe gran interés por la medicina tradicional y dentro de ésta la medicina herbaria, que ha generado numerosos estudios divulgados en prestigiosas publicaciones. Pero, hay poco uso de medicamentos de origen vegetal por parte de los profesionales de la salud; sus tratamientos están basados únicamente en fármacos sintéticos, incluso, en el tratamiento de problemas de salud diagnosticados como enfermedades leves (Martínez y Gómez, 2013).

En la actualidad se ha observado una importante resistencia a los antibióticos por parte de una gran cantidad de microorganismos. Por ello, en los últimos años se han realizado muchas investigaciones, que han demostrado el poder antimicrobiano que poseen los aceites esenciales, especialmente los extraídos de frutas cítricas (Dabbah, Edwards y Moats, 1970).

Los aceites son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y cubren un amplio espectro de actividades tales como efectos farmacológicos, antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos; otros tienen características biocidas contra una amplia gama de organismos como bacterias, hongos, virus, protozoos, insectos y plantas. Por ello, son importantes en la industria de alimentos (condimentos y saborizantes), cosmética (perfumes y aromatizantes) y farmacéutica (Smith, Stewart y Fyfe, 1998).

Esta investigación se realizó con la finalidad de aportar datos que sean útiles a futuro, sobre la composición química del aceite esencial de las hojas de la especie *Citrus sinensis* L. y su potencial antibacteriano frente a bacterias patógenas ATCC.

Objetivos de la Investigación

Objetivo general

Determinar la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie *Citrus sinensis* L., en cepas bacterianas.

Objetivos específicos

- Obtener el aceite esencial de las hojas de *Citrus sinensis* L. empleando la técnica de hidrodestilación.
- Identificar la composición química del aceite esencial de las hojas de la especie *Citrus sinensis* L., utilizando la técnica de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.
- Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de la especie *Citrus sinensis* L., por medio de la técnica de difusión en agar con discos (Kirby-Baier).

Alcances y limitaciones de la Investigación

Alcances

El proceso de la investigación, o de un estudio depende de las estrategias de investigación a seguir. Así, los alcances de esta investigación se relacionan con la profundidad del conocimiento que el autor desea obtener. Con relación a esto, Hernández, Fernández y Baptista (2010), hacen referencia de la profundidad de una investigación como un conjunto de conocimientos en un campo o medio continuo. En este sentido, la investigación tiene como alcance aportar nuevos datos sobre la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Citrus sinensis* L.

Limitaciones

Durante el desarrollo del trabajo de investigación se presentaron limitaciones relacionadas con los aspectos teóricos, técnicos y recursos económicos (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). En tal sentido, una de las limitaciones de esta investigación ha sido la escasez de información sobre la composición química del aceite esencial de las hojas de *Citrus sinensis* L., y su actividad antibacteriana; otras limitaciones externas a la investigación son causadas por fallas energéticas presentadas en el país.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

La presente investigación se orientó en destacar las propiedades antibacterianas de las hojas de *Citrus sinensis* L., en tal sentido se presentan a continuación algunas referencias bibliográficas que guardan relación con la investigación.

Matuka, Oyedeji, Gondwe, y Oyedeji, (2020). Analizaron la composición química y actividad antiinflamatoria *in vivo* de los aceites esenciales de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck que crece en Sudáfrica. El propósito de este estudio fue determinar el perfil químico de los aceites esenciales extraídos de hojas y cáscaras (frescas y secas) de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, mediante cromatografía de gases (CG) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) y evaluar el potencial antiinflamatorio de los aceites esenciales. El análisis arrojó cuarenta (40) y cincuenta y cuatro (54) compuestos que representan el 91,5 % y 99,6 % identificados respectivamente en los aceites esenciales de hojas frescas y secas. Los compuestos principales en el aceite esencial de las hojas frescas fueron sabineno (20,4 %) y terpinen-4-ol (13,2 %), mientras que el β -elemeno (16,3 %) y el sabineno (10,7 %) se identificaron en el aceite esencial de hojas secas. En los aceites de cáscara fresca y seca, se identificaron veinticuatro (24) y veinticinco (25) compuestos que representan el 99,3 % y 99,4 % respectivamente, siendo el limoneno (80,5-73,6 %) el compuesto más predominante. Además, concluyeron que los compuestos de aceites esenciales bioactivos de cáscara y hojas secas de *Citrus sinensis* suprimieron significativamente ($p < 0,01$) el edema en la pata trasera de las ratas, principalmente a un nivel de dosis de 200 mg/Kg, lo que indica una buena actividad antiinflamatoria. La abundancia de limoneno en el aceite

esencial de cascaras, y de β -elemeno y sabineno en el aceite esencial de hojas desempeñó un papel importante en las propiedades antiinflamatorias de *Citrus sinensis*. Hasta donde sabemos, este es el primer informe completo sobre el perfil químico de *C. sinensis* cultivada en Sudáfrica a pesar de ser un importante país productor de cítricos. Este estudio mantiene relación con la investigación, ya que en él se determinó los principios activos de las hojas de la especie *C. sinensis*.

Castañeda, Rivera, Choy, Munguía, Portillo y Muñoz, (2018). En su estudio: Actividad antimicrobiana del aceite de naranja residual, extrajeron el aceite de naranja a partir de cáscara residual y determinaron sus componentes químicos y su actividad antimicrobiana. Utilizando el método de destilación Soxhlet, extracción líquido-líquido y extracción de prensado, y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Evaluando la actividad antimicrobiana mediante la técnica de Kirby-Bauer modificada en *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Trichoderma* sp. y *Verticillium* sp., llegaron a concluir que, el método Soxhlet fue el más eficiente para la obtención del aceite (2,065 %). Observaron valores de inhibición de 75 % a 100 % para *S. aureus* y *P. aeruginosa*; 75 a 100 % para *Candida albicans* y 50 a 74 % para *Pseudomonas aeruginosa*. Actuando como antimicrobiano para todas las cepas. El perfil CG-EM fue: D-limoneno 85,93 %, β -mirceno 2,23 %, linalool 1,72 %, decanal 0,63 %, α -pineno 0,43 % y sabineno 0,20 %. Este estudio guarda relación con la presente investigación, ya que se evaluó la actividad antimicrobiana, así como también se determinó la composición química del aceite esencial de la cáscara residual de la naranja generada por comercios informales en Puebla – México.

Liu, Deng, Cao y Chun, (2018). Realizaron un estudio titulado: Composición química de los aceites esenciales de las cáscaras, hojas y flores de naranjas navel “Newhall” y “Gannanzao”. Los aceites esenciales de las pieles, hojas y flores de naranjas provenientes de Newhall y Gannanzao, se extrajeron mediante el método de extracción por destilación simultánea y se analizaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). Se identificaron un total de setenta y dos

(72) componentes. De los cuales veintisiete (27) compuestos corresponden a la cáscara, cuarenta y cuatro (44) de las hojas y treinta y nueve (39) de las flores en los aceites esenciales provenientes de Newhall; además se identificaron treinta y ocho (38), treinta y nueve (39) y cuarenta y dos (42) compuestos en los aceites esenciales de las cáscaras, hojas y flores respectivamente de la naranja de Gannanzao, para un total de 6 aceites. El limoneno fue el componente predominante en los aceites de las pieles de ambos grupos de naranjas, representando el 81,62 % y el 88,07 % de la composición total. No obstante, en los aceites esenciales de las hojas, se encontraron que sabineno, limoneno, linalol y citronelal fueron componentes abundantes de estos aceites esenciales. Sabineno, linalool y nerolidol fueron los componentes principales de los aceites esenciales de flores. En este estudio, se observó, que el porcentaje de componentes de los aceites esenciales se vio afectado por diferentes variedades y órganos. Mientras que en los aceites esenciales de los mismos órganos los constituyentes mostraron ciertas similitudes, pero algunas diferencias en el contenido. Lo anteriormente descrito en este estudio tiene relación con la presente investigación, ya que se determinó la composición química del aceite esencial de la piel, hojas y flores de naranja.

Bozkurt, Gülnaz, y Aka Kaçar, (2017). En su investigación titulada: Composición química de los aceites esenciales de ciertas especies de *Citrus* y evaluación de la actividad antimicrobiana. En este estudio los investigadores recolectaron frutas de diferentes variedades de *Citrus* del mercado local en Adana/Turquía. Los aceites esenciales de las cáscaras se extrajeron utilizando el método de hidrodestilación. Las composiciones de aceites esenciales de estas variedades de *Citrus* fueron analizadas por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM); determinando que los componentes de los aceites extraídos eran α -pineno, sabineno, β -pineno, β -mirceno, D-limoneno, linalol, *m*-cimeno y 4-terpineol. Según los resultados, el componente principal fue D-limoneno (66-93 %). Investigaron la actividad de los aceites esenciales contra los siguientes microorganismos *Eschechiria coli*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis*, utilizando un método de difusión por disco. El aceite esencial

de la naranja *C. sinensis* (L.) Osbeck, mostró la mayor actividad antimicrobiana frente a todas estas bacterias. Sin embargo, la mandarina clementina y la naranja agria no mostraron actividad frente a *E. coli* y *S. typhimurium*. Esta investigación guarda relación con el presente trabajo, ya que emplearon la especie de *Citrus sinensis* L. a la cual se le identificó la composición química y se determinó la actividad antimicrobiana.

Torrenegra, Pájaro y León (2017). Realizaron una investigación sobre: Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*. El objetivo de este trabajo fue: Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus* frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. En este trabajo, se obtuvieron los aceites esenciales, mediante hidrodestilación (HD) e hidrodestilación asistida por la radiación con microondas (MWHD), utilizando el pericarpio de las especies vegetales de naranja (*Citrus sinensis*), limón (*Citrus aurantifolia*), mandarina (*Citrus reticulata*), y pomelo (*Citrus paradisi*), cultivadas en el norte del departamento de Bolívar (Colombia). Donde se midió la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración mínima bactericida (CMB). Las bacterias se replicaron en medios de agar y caldos específicos. Se determinó el momento de máxima densidad óptica (DO620) para emplearlo como tiempo de incubación; luego se hicieron pruebas de evaluación de sensibilidad con la exposición de las cepas a concentraciones a 1000 $\mu\text{g/mL}$ del extracto en caldo. Para solubilizar se empleó dimetilsulfóxido (DMSO) al 1 %. Posteriormente, se le determinó la concentración mínima inhibitoria mediante metodologías de microdilución en caldo y la concentración mínima bactericida. Los resultados reportaron una actividad de los aceites esenciales del género *Citrus*, con valores de $\text{CIM} \geq 600 \mu\text{g/mL}$ frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. En función a los resultados obtenidos, concluyeron, que las diferentes especies del género *Citrus* son consideradas como promisorias para el control del componente bacteriano. Guarda relación con la presente investigación, ya

que se empleó el aceite esencial de la especie *Citrus sinensis* L. para evaluar la actividad antibacteriana del mismo frente a ciertos microorganismos patógenos.

Al respecto los investigadores, Geraci, Di Stefano, Di Martino, Schillaci y Schicchi, (2016), realizaron un estudio titulado: Componentes de aceites esenciales de cáscaras de naranja y actividad antimicrobiana, cuyo objetivo fue determinar la composición química de aceites esenciales obtenidos de las cáscaras de naranja de 12 cultivos de *Citrus sinensis* L. del Centro-este de Sicilia. Para ello, recolectaron naranjas pertenecientes a 12 regiones diferentes de Sicilia. La obtención del aceite esencial la realizaron mediante destilación al vapor y los extractos mediante extracción con hexano. Los componentes químicos fueron identificados por Cromatografía de Gases–Espectrometría de Masas. Concluyendo que el componente principal fue el δ -limoneno en un 73,9 – 97 % y porcentajes menores de linalool, geraniol y nerol. La actividad antimicrobiana fue medida contra tres microorganismos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogens* y *Pseudomonas aeruginosa*) obteniéndose que el aceite esencial de los cultivos “Sanguinello y Solarino Moro” fueron significativamente activos frente a *L. monocytogens*, mientras que el cultivo “Valencia” obtenido del extracto hexánico fue activo contra los tres patógenos estudiados. Este estudio guarda relación con la presente investigación, ya que se determinó la composición química del aceite esencial *Citrus sinensis* L. en Italia, así como también se evaluó la actividad frente a microorganismos patógenos.

Antecedentes Históricos

Las plantas medicinales y aromáticas juegan un papel importante en el cuidado de la salud de las personas en el mundo, especialmente en países en desarrollo. Hasta el advenimiento de la medicina moderna, el hombre depende de ellas para el tratamiento de sus enfermedades y las de los animales (Zambrana, 2005).

Desde los comienzos de la humanidad, los aceites esenciales han acompañado al hombre por sus propiedades sanadoras. En el antiguo Egipto, las propiedades antisépticas de los aceites esenciales eran aprovechadas durante el proceso de embalsamamiento y la conservación de las momias, así como para la fumigación y fabricación de ungüentos. Los aborígenes de Australia eran grandes consumidores de Tea tree, un gran árbol que proporciona un aceite esencial muy apreciado y utilizado en nuestros días (Cañate, 2010).

Los cítricos se cultivan desde épocas remotas (más de 4000 años). Sus frutas atrajeron la atención de los pueblos primitivos, que se supone ya las cultivaban mucho tiempo antes de que aparecieran en los países europeos. Se sabe que la apariencia de la fruta y sus flores cautivaron a los primeros viajeros, que no sólo la describieron en sus memorias, sino que la llevaron a otras regiones. Las primeras frutas conocidas en Europa hacia 310 (A.C.) pertenecían al grupo de las cidras (*Citrus medica* L.), originario de la región comprendida entre el sur de China e India. Las limas (*Citrus aurantifolia* Swingle) aparentemente se originaron en el este de la India. Desde allí fueron difundidas a través del Mar de Omán (Gmitter y Hu, 1990).

La naranja dulce (*C. sinensis* L.), originaria del sudeste de China, probablemente haya sido llevada a Europa por los romanos. Sin embargo, hay evidencias del cultivo de naranjas antes de la destrucción de Pompeya (ocurrida en el año 79 D.C.), según se observa en un mosaico entre las ruinas de la ciudad. Se sabe con certeza que las naranjas fueron cultivadas por varias centurias en China, antes que los europeos la conocieran y sus referencias se encuentran en manuscritos y documentos muy antiguos (Caballero, Finglas y Trugo, 2003). A partir de su dispersión desde el centro de origen, es poco lo que se conoce sobre la manera en que se han distribuido los

cítricos. Desde Asia fueron llevados al norte de África y al sudeste de Europa. Posteriormente fueron traídos a América por los europeos, alrededor del 1500. La naranja de ombligo Washington se originó en Bahía, Brasil, y desde allí fue llevada a Australia, y a Florida y California en los EE.UU (Gmitter y Hu, 1990).

Bases Teóricas

Aspectos Generales de la Familia Rutaceae

La familia Rutaceae comprende un amplio número de plantas con alto potencial químico y farmacológico. Muchas de estas especies han sido importantes por la aplicabilidad que poseen dentro de la medicina folclórica tradicional; que va desde el tratamiento de enfermedades en la piel, de tipo alérgico como la curación de ulceraciones y heridas superficiales, hasta la atención de enfermedades gastrointestinales como diarrea, disentería (Anaya, Macias, Cruz, Sánchez, 2005). También se usan como febrífuga (Heneka, Rimpler, Ankli, Sticher, Gibbons y Heinrich, 2005), estimulante, para afecciones paralíticas, diuréticas, analgésicas (Anaya, y col. 2005), antídoto contra mordedura de serpiente, hemorragias, cataratas (Rana, Juyal, Rashmi, Blazquez, 2004) y reumatismo (Wang, Ju, Chen y Hu, 2003). En general las especies de la familia Rutaceae se caracterizan porque de ellas se ha aislado un significativo número de metabolitos secundarios, principalmente alcaloides, cumarinas y algunos tipos de lignanos, que se caracterizan por poseer una lista interesante de actividades biológicas (Kuzovkina, Al'terman, y Schneider, 2004).

Descripción Botánica

La familia Rutaceae cuenta con alrededor de 1600 especies reunidas en 140 géneros, distribuidas en zonas templadas y tropicales de ambos hemisferios, pero más numerosas en Sudamérica y Australia; incluye formas biológicas arbóreas, arbustivas y herbáceas (Lawrence, 1951). Dendrológicamente, esta familia se caracteriza por

tener las hojas compuestas unifolioladas, trifolioladas o pinadas; filotaxis alterna u opuesta; sin estípulas; aromáticas, con puntos traslúcidos en las hojas, responsables de los olores que son propios de cada especie y que se perciben al estrujarse las hojas y exudados de la corteza. Este carácter organoléptico es utilizado como diagnóstico para el reconocimiento de la familia en el campo (Macbride, 1949; Cowan y Smith, 1973; Hutchinson, 1982; Spichiger y Stutz , 1987). La mayoría de las especies de esta familia presenta aguijones tanto en hojas y ramos, como en el tronco, principalmente el género *Fagara*, y generalmente espinas únicas en las axilas de las hojas en el género *Citrus* (Escalante, 1961).

Clasificación Taxonómica

Las Rutaceae son plantas angiospermas pertenecientes al orden Sapindales que agrupa alrededor de 160 géneros y 1.600 especies (Cowan y Smith, 1973). Su clasificación taxonómica y mención de algunos géneros más conocidos se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la familia Rutaceae

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Sapindales
Familia:	Rutaceae

Fuente: Cowan y Smith, 1973.

Hábitat y Distribución Geográfica

Las Rutaceae habitan primariamente en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios Este y Oeste (Figura 1). (Cowan y Smith, 1973). Presenta 161 géneros y 1700 especies (Zoluaga, Morrone y Rodríguez, 1999).

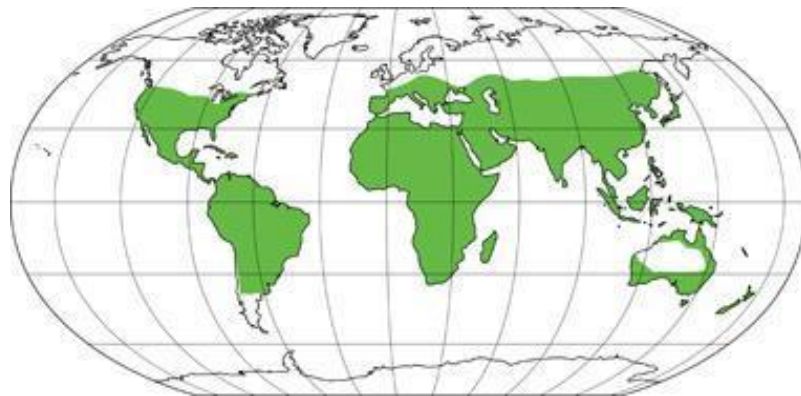


Figura 1. Hábitat y distribución geográfica de la familia Rutaceae (Stevens, 2001).

Género *Citrus* L.

El género *Citrus* L. (Aurantioideae, Rutaceae) comprende algunas de las especies de árboles frutales de mayor relevancia económica mundial. Es nativo de las zonas cálidas del sur y sudeste de Asia hasta las zonas templadas de China, Australia e islas del Pacífico sudoccidental. Tiene una larga historia de domesticación, y especies ampliamente difundidas en cultivo, muchas veces, se han naturalizado en las zonas cálidas y templado-cálidas del mundo (Stampella, Delucchi, Keller y Hurrelle 2014).

Descripción Botánica

Los cítricos pertenecen a la familia de las Rutáceas. Las plantas del género *Citrus*, cultivadas comercialmente están compuestas por dos partes. La parte superior, que incluye parte del tronco, ramas, hojas, frutos denominada copa. La parte inferior, que también está formada por parte del tronco, generalmente los primeros 15 centímetros del suelo de donde emerge todo el sistema radicular. Las hojas de los cítricos son unifoliadas y de nerviación reticulada, sin embargo, en el género *Poncirus* y sus híbridos son trifoliadas. Las nerviaciones son reticuladas, los peciolo son alados en

muchas especies como en el naranjo amargo, el aepé, los pomelos y las toronjas, mientras que los peciolos son pequeños en las naranjas y mandarinas y en los limones apenas son visibles. La raíz de los cítricos es sólida, blanca y bajo condiciones de cultivo poseen una gran cantidad de pelos radiculares superficiales. Presenta una raíz principal del que salen las raíces secundarias formando una masa densa de raíces. La flor aparece generalmente después del reposo invernal o tras un periodo de sequía, se inicia la formación de flores a partir de las yemas situadas en las axilas de las hojas. La diferenciación floral tiene lugar al mismo tiempo que se inicia la brotación, de modo que las yemas inicialmente dan lugar a brotes vegetativos, pero en ocasiones el meristemo apical del brote en crecimiento se transforma en una flor terminal. El fruto de los cítricos es una baya denominada hesperidio surge como consecuencia del crecimiento del ovario. El pericarpio es la parte más externa del fruto y está formada por el exocarpo, el mesocarpo o albedo y el endocarpo donde se inician los sacos de jugo o vesículas que abarcan la mayor parte de los frutos en desarrollo (Beñatena, 1972).

www.bdigital.ula.ve

Especies del Género Citrus

Citrus es el cultivo de árboles frutales más ampliamente producido en el mundo. La mayoría de las especies de cítricos cultivadas son parte del género *Citrus* que contiene, según el taxonomista, entre 16 y 156 especies. Siendo las más cultivadas las descritas en la tabla 2 (Beñatena, 1972).

Tabla 2. Especies más cultivadas del género *Citrus*

Nombre científico	Nombre común
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Naranjas dulces
<i>Citrus aurantium</i> L.	Naranjas agrios
<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Mandarinas
<i>Citrus paradisi</i> Macf	Pomelos
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	Limas ácidas
<i>Citrus limón</i> (L.)	Limones verdaderos
<i>Citrus medica</i> L.	Cidras
<i>Citrus maxima</i> (L.).	Toronjas

www.bdigital.ula.ve

Componentes Volátiles del Género Citrus

En los frutos cítricos la mayoría de los compuestos volátiles son responsables del aroma característico; siendo de naturaleza terpenoide y se acumulan en estructuras especializadas, glándulas de aceite en el flavedo y los cuerpos de aceite en la pulpa, siendo el limoneno el mayoritario, así como otros monoterpenos y sesquiterpenos o sus derivados oxigenados y los norisoprenoides (Yáñez, Lugo y Parada, 2007); en la tabla 3 se describen algunos de ellos.

Tabla 3. Algunos de los componentes volátiles encontrados en especies del género *Citrus*

Especie	Componentes	Partes utilizadas	Localidad	Referencia
<i>Citrus aurantium</i> L.	Acetato de linalilo (19,3 %), Linalol (17,3 %), (E, E)-Farnesol (13,0 %), (E)-Nerolidol (12,4 %).	Flores y hojas	Croacia	Družić, Jerković, Marijanović y Roje (2016)
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.)	β -pineno (12,6 %), Limoneno (53,8 %), γ -terpineno (16,5 %), Terpinoleno (0,6 %), α -terpineol (0,4 %) Citral (2,5 %)	Corteza	Italia	Costa, Bisignano, Filocamo, Grasso, Occhiuto y Spadaro (2014).
<i>Citrus aurantifolia</i>	Limoneno (26,77 %) Linalool (11,5 %) <i>trans</i> -carveol (5,2 %) Óxido de <i>trans</i> -limoneno (1,8 %)	Corteza	Mérida - Venezuela	Parra y Rivas (2014)
<i>Citrus reticulata</i> L.	Limoneno (74,7 %) y λ -terpineno (15,7 %)	Corteza	Valencia-España	Viuda, Ruiz, Fernández y Pérez (2013)
<i>Citrus limon</i> L.	limoneno (69,9%), β -pineno (11,2%)	Corteza	Valencia-España	Viuda y col., (2013)
<i>Citrus paradisi</i> L.	Limoneno (96,2 %), Mirceno (1,4 %)	Corteza	Valencia-España	Viuda y col., (2013)

Especie *Citrus sinensis* L.

Descripción Botánica

Es un árbol (Figura 2), perteneciente a la familia Rutáceas, que presenta una longitud de hasta 10 metros de altura, con copa muy redondeada. Tallos ligeramente espinosos. Hojas coriáceas, elípticas o elípticolancelada, agudas y con el peciolo provisto de alas estrechas. Sus flores de color blanco muy perfumadas y con 5 pétalos y numerosos estambres. El fruto (la naranja) es un hesperidio con la corteza bastante lisa y sabor dulce o agrio, ni amargo, cuya clasificación taxonómica se describe en la tabla 4 (Bernácer, 2011).



**Figura 2. Árbol de naranjo (*Citrus sinensis* L.)
Foto tomada por: Paola Cubillan**

Tabla 4. Clasificación taxonómica de la especie *Citrus sinensis* L.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Sapindale
Familia:	Rutaceae
Género:	<i>Citrus</i>
Especie:	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck

Origen y Distribución

Es originaria del sureste de China y norte de Birmania, aunque se la conoce en el área mediterránea desde hace aproximadamente tres mil años. Desde su lugar de origen, el naranjo se extendió a Japón y a lo largo de la India, llegó a Occidente, por la Ruta de la Seda. Los árabes la introdujeron en el sur de España en el siglo X, aunque el naranjo dulce no fue conocido hasta 1450. A partir de ese momento fue extendiéndose por toda Europa, alcanzando gran popularidad durante la segunda mitad del siglo XV (Martínez, 2016). Según FAO (2011), en Venezuela para el año 2009 había aproximadamente unas 37.339 hectáreas de cítricos; siendo la naranja (*Citrus sinensis* L.) la principal fruta procesada en Venezuela, ya que más del 35% de su producción se industrializa.

Componentes volátiles de la especie Citrus sinensis L.

La composición química de la especie *Citrus sinensis* L. está constituida principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos oxigenados. (Luna, 2007). Algunos de los componentes se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Algunos componentes del aceite esencial de la especie *Citrus sinensis* L.

Componentes	Parte utilizada	Localización	Referencia
Isocitroneleno (0,43 %), Canfeno (1,62 %), <i>trans-p</i> - mentano (0,63 %), <i>p</i> -menta- 1(7), 8-dieno (0,69 %), Limoneno (90,93 %), Dihidromircenol (0,45 %), <i>trans</i> -dihidrocarvona (1,78 %)	Corteza	Labateca (Norte de Santader, Colombia)	Yáñez, Lugo y Parada (2007)
Limoneno, β -linalol y decanal	Pericarpio	Lima-Perú	Juárez y col., (2011)
Limoneno (94,9 %)	Corteza	España	Viuda y col., (2013)
D-limoneno (73,9-97 %), Linalool, Geraniol, Nerol	Corteza	Sicilia-Italia	Geraci y col., (2016)
D-limoneno (85,93 %), β - mirceno (2,23 %), linalool (1,72 %), decanal (0,63 %), α - pineno (0,43 %) y sabineno (0,20 %)	Cortezas	México	Castañeda y col., (2018)
Sabineno (20,4 %), Terpinen-4- ol (13,2 %), β -elemeno (16,3 %) Sabineno (10,7 %)	Hojas frescas y secas	Sudafrica	Matuka, y col., (2020)

Actividad Antibacteriana de los Aceites esenciales de la especie Citrus sinensis L. en diferentes localidades.

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales de la especie *Citrus sinensis* L. ha sido descrita por autores como: Guerra y col., (2014); Obidi, Adelowotan,

Ayoola, Johnson, Hassan y Nwachukwu, (2013) y Juárez y col., (2010), que en sus investigaciones han encontrado que el aceite esencial de esta especie posee actividad antibacteriana frente a microorganismos patógenos.

Según Guerra y col. (2014), “el aceite esencial de las cortezas de naranja presentó actividad antibacteriana frente a las bacterias gramnegativas (*E. coli* ATCC 35218 y *P. aeruginosa* ATCC 27853), con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 9 y 10 % respectivamente”. Obidi y col (2013), también revelaron que el aceite esencial de las cortezas de naranja, presentó efectos inhibitorios contra todos los organismos patógenos estudiados. Esto confirma el hecho de que las especies naturales como la naranja pueden tener una actividad antibacteriana contra patógenos y podrían ser utilizados para la prevención de enfermedades.

Juárez y col. (2011), la actividad antibacteriana *in vitro* la realizaron por el método de difusión en agar y en la formación de halos de inhibición contra cepas de patógenos; “determinaron que el aceite esencial de la cascara de la fruta, presentó actividad antibacteriana significativa frente a los microorganismos Gram positivos: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* cepa clínica, a las concentraciones de 50 y 100 %, más no presentó actividad antibacteriana contra microorganismos Gram negativos: *Bacillus subtilis* cepa clínica, *Escherichia coli* cepa clínica y *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*”.

Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes) (Ashurt, 1999). Son incoloros o ligeramente amarillos; haciendo de su densidad inferior a la del agua. Poseen un índice de refracción elevado; y a su vez, son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, liposolubles y muy

poco solubles en agua, sin embargo, se separan mediante vapor de agua. Además de esto, están conformados por mezclas complejas y muy variables de constituyentes que pertenecen, de manera casi exclusiva, a dos grupos característicos por orígenes biogénicos distintos: el grupo de los terpenoides por una parte y el grupo de los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano, muchos menos frecuentes. Pueden también contener diversos productos procedentes de procesos de degradación que afectan a constituyentes no volátiles (Bruneton, 2005).

Terpenoides

En los aceites esenciales se encontrarán únicamente los terpenos más volátiles, es decir, aquellos cuya masa molecular no es demasiado elevada: mono- y sesquiterpenos. Los monoterpenos: casi siempre se encuentran hidrocarburos. Estos pueden ser acíclicos (miceno, ocimeno), monocíclicos (α - y γ -terpineno y *p*-cimeno) o bicíclicos (pinenos, Δ^3 -careno, canfeno, sabineno). A veces constituyen más del 90 % del aceite esencial, especialmente del género *Citrus*. Los sesquiterpenos: son variaciones estructurales de la misma naturaleza, siendo las más frecuentes hidrocarburos, alcoholes y cetonas. Entre los ejemplos de sesquiterpenos más característicos de aceites esenciales están: hidrocarburos mono- o policíclicos (β -bisaboleno, β -cariofileno, longifoleno), alcoholes (farnesol, carotol β -santalol, patchulol), cetonas (nootkatona, *cis*-longipinano-2-7-diona, β -vetivona), aldehídos (sinensales) y ésteres (acetato de cedrilo) (Bruneton, 2005).

Compuestos Aromáticos

Los derivados del fenilpropano (C₆-C₃) son muchos menos frecuentes que los precedentes. Se trata generalmente de alil- y propenilfenoles, a veces de aldehídos, característicos de determinados aceites esenciales (Bruneton, 2005).

Compuestos de Orígenes Diversos

Se trata de compuestos que resultan de la transformación de moléculas no volátiles, que contribuyen a los aromas de los frutos. Teniendo en cuenta su modo de preparación, las esencias concretas y las absolutas los pueden contener. Igual ocurre con los aceites esenciales cuando son arrastrados por vapor de agua (Bruneton, 2005).

Técnicas de Extracción

Según la variedad del material vegetal, parte de la planta a emplear y estabilidad del aceite esencial que se pretenda obtener, se emplean diversos procedimientos físicos y químicos de extracción, donde su correcta aplicación será lo que determine la calidad del producto final (Bruneton, 2005).

Destilación por Arrastre de Vapor

La técnica consiste en vaporizar dos líquidos inmiscibles a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor agua. El vapor ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y disminuir la temperatura de ebullición al adicionar la tensión (presión) del vapor, que se inyecta, a la de los componentes volátiles de los aceites esenciales. Los vapores que salen se enfrían hasta condensar y los dos líquidos inmiscibles: agua y aceite esencial, finalmente, se separan por gravedad (Sovová y Slavcho, 2006).

En general los componentes del equipo de destilación para extraer aceite esencial son: (Albarracín y Gallo, 2003).

- Fuente de energía.
- Destilador.
- Intercambiador de calor.
- Decantador.

Hidrodestilación

La hidrodestilación es un método de extracción de aceites esenciales en el cual el material está sumergido en agua en ebullición, la característica principal de este proceso es el contacto directo del agua y el material del cual se extraerá el aceite esencial. En este caso, el material a destilar está sumergido en agua y, una vez que hierve el agua, el vapor arrastra los compuestos volátiles que, al pasar por un serpentín con refrigerante, condensan y se pueden separar por diferencia de densidades (figura 3), (León, 2015).



Figura 3. Equipo de hidrodestilación

Análisis de los Componentes de los Aceites Esenciales

La identificación de los componentes presentes en los aceites esenciales no es una tarea simple. Anteriormente, esta identificación se convertía en una larga y tediosa operación, que consumía muchísimo tiempo, ya que requería el aislamiento y purificación de cada componente (utilizando, por ejemplo, cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, destilación fraccionada, etc) y su posterior

determinación estructural por métodos tradicionales (obtención de derivados, reacciones de coloración, pruebas de grupos funcionales, etc) (Albarracín y Gallo, 2003). En las últimas décadas, el desarrollo de técnicas instrumentales de análisis y su acoplamiento a sistemas informáticos y bases de datos, ha cambiado sustancialmente el panorama, agilizando de forma notable la identificación de los componentes de las esencias, han contribuido especialmente a este cambio, el desarrollo de técnicas como:

- ✓ Sistemas Cromatográficos acoplados a técnicas Espectroscópicas, especialmente la Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (CG-EM) y la Cromatografía de Gases acoplada a la Espectroscopia Infrarroja (CG-EIR) (Bandoni, 2000).

Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (CG-EM)

La cromatografía de gases (CG), es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la división de mezclas muy complejas; que, una vez separados, son detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos (Casas, García, Guadayol y Olivé, 1994). Por otra parte, la espectrometría de masas (EM) es una técnica de análisis que permite determinar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa. El espectrómetro de masas es un dispositivo que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación entre masa y carga (Barber, Bordoli, Sedgwick y Tyler, 1981).

Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 μm , por lo general) y diversas formas

incluyendo esferas, barras y hélices. Pertenecen al reino procariotas, por lo tanto, no tienen núcleo ni orgánulos internos. Generalmente poseen una pared celular compuesta de peptidoglucanos. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento (Tortora, Funke y Case, 2007).

Morfología microscópica

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma: cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones, rectos o curvos) y espirilos (espiral), dentro de estas últimas se encuentran: *Treponema*, *Borrelia* y *Leptospira* (Tortora y col. 2007).

Morfología macroscópica

La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente y son visibles como colonias cuando se las siembra en medios de cultivo sólidos adecuados. Requieren una incubación de aproximadamente 24 horas en una atmósfera que favorezca su desarrollo, a temperatura óptima. Existen excepciones como *M. tuberculosis*, que requiere para su desarrollo de dos a ocho semanas de incubación (Tortora y col. 2007).

Estructura bacteriana

Las diferentes estructuras bacterianas que observamos, las podemos dividir, según sean constantes en las células o no, en estructuras permanentes o variables. Dentro de las primeras se destaca: la pared celular, la membrana celular, los ribosomas y el material genético. Las estructuras variables son: los flagelos, las fimbrias o pilis, la cápsula y los esporos (Prescott, Harley y Klein, 1999).

Mecanismo de la tinción de Gram

Este mecanismo se basa en las diferencias de la estructura de la pared celular y en la forma en que reacciona frente a diversos reactivos. El principal colorante que se emplea en esta técnica es el violeta de genciana o cristal violeta, que tiñe de color violeta a las células. La aplicación del yodo determina la formación de cristales con el colorante que no pueden atravesar la pared celular debido a su gran tamaño. La aplicación del alcohol deshidrata el peptidoglucano de las células grampositivas y las torna aún más impermeables a los cristales de violeta de genciana-yodo. En el caso de las células gramnegativas el efecto es muy diferente, dado que el alcohol disuelve la membrana externa e incluso crea en la delgada capa de peptidoglucano orificios a través de los cuales se difunde los cristales de violeta-yodo. Como las bacterias gramnegativas se tornan incoloras después del lavado con alcohol, el agregado de safranina (tinción de contraste) determina que las células adquieran un color rosado (Tortora y col. 2007).

Pared celular de las Bacterias grampositivas

En la mayoría de las células grampositivas, la pared celular está compuesta por varias capas de peptidoglucano que conforman una estructura gruesa y rígida, representando hasta el 90% de la pared celular, aunque también presentan embebidos en dicha estructura a los ácidos teicoicos, los cuales son polímeros de la pared celular, formados por unidades de ribitolfosfato o glicerolfosfato, siendo estos responsables de la carga negativa de la superficie de las bacterias y pueden intervenir en el paso de iones a través de la pared celular (Tortora y col. 2007).

Pared Celular de las Bacterias gramnegativas

La pared celular de las bacterias gramnegativas está compuesta por una capa o por muy pocas capas de peptidoglucano y una membrana externa. El peptidoglucano está

unido a las lipoproteínas de la membrana externa y se encuentra en el periplasma, una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática. El periplasma contiene una concentración elevada de enzimas degradantes y proteínas de transporte. La pared celular de las bacterias gramnegativas no contiene ácidos teicoicos y el hecho de que contenga una escasa cantidad de peptidoglucano aumenta su susceptibilidad a la ruptura mecánica (Tortora y col. 007).

Bacterias grampositivas

Staphylococcus aureus

Pertenece a la familia: Staphylococcaceae Género: *Staphylococcus* Especie: *S. aureus*. Está formado por cocos grampositivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas (Kloss, Schleir, y Goirtz, 1992). Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos (Kuroda, Ohta, Uchiyama y Baba, 2001). Es un microorganismo que se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente ya que posee características particulares de virulencia y resistencia contra antibióticos, lo cual representa un grave problema de salud, esto es, gracias a que su distribución se extiende a nivel mundial y el impacto en la morbimortalidad es considerable a nivel comunitario e intrahospitalario (Harris, Foster y Richards, 2002).

Enterococcus faecalis

Los *Enterococcus* son bacterias esféricas u ovoides, de tamaño 0,6-2,0 \times 0,6-2,5 μm . Son cocos grampositivos, no formadores de endosporas. Se presentan en forma

de pares o de cadenas cortas, no móviles. Pertenecen a la familia Enterococaceae, del género *Enterococcus*, especie *E. faecalis*; es una bacteria inmóvil, anaerobia facultativa y fermenta la glucosa sin producir gas. No presenta una reacción con la catalasa en presencia de peróxido de hidrógeno, puede producir una reacción pseudocatalasa si se cultiva en agar sangre, sin embargo ésta es muy débil. *E. faecalis* puede vivir en ambientes extremos que incluyen pH altamente alcalino de 9,6 y elevadas concentraciones de sal. Son quimiorganotrofos, forman parte de la flora normal gastrointestinal y del tracto genitourinario femenino. Los *Enterococcus* han pasado de ser agentes comensales de escasa patogenicidad a convertirse en la segunda o tercera etiología más frecuente de infección nosocomial. Su diseminación por los pacientes hospitalizados se ve facilitada ya que poseen una serie de características que se lo permiten, como el poseer un reservorio continuo para su diseminación intrahospitalaria pudiendo colonizar el tracto gastrointestinal. Pudiendo causar endocarditis, infecciones de vejiga, próstata, epidídimo; las infecciones de sistema nervioso son menos comunes (Quiñones y col, 2008).

Bacterias gramnegativas

Pseudomonas aeruginosa

Es un patógeno ubicuo, oportunista y bastante persistente en el medio ambiente. Esta bacteria tiene forma de bastón aproximadamente de 0,5-1 μm en diámetro y de 1,5-5 μm de largo (Peix, Ramírez y Velázquez, 2009). Cuentan con un flagelo polar que le confiere la motilidad necesaria. Se considera a esta especie como bacteria aerobia facultativa debido a la capacidad que tiene para crecer en medios anaerobios tomando el nitrógeno o arginina como terminal de aceptación de protones (Sousa, Soares, Santos, 2013). Este patógeno ubicuo en el medio ambiente puede llegar a persistir de manera eficaz en el agua y en el suelo viviendo con un requerimiento nutricional mínimo y tolerando diversos medios físicos. Puede crecer entre 20 y 43°C, y al crecer en altas temperaturas se diferencia del resto de las otras especies

de *Pseudomonas*. Se caracteriza por ser parte del grupo de no fermentadores que tienen en común la incapacidad de fermentar lactosa, con la capacidad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno como acetato y amoníaco, obteniendo energía de la oxidación de azúcares. La mayoría de las infecciones por *P. aeruginosa* se producen en pacientes internados, en especial los debilitados o inmunocomprometidos. La *P. aeruginosa* es una causa frecuente de infecciones en las unidades de cuidados intensivos. Los pacientes infectados por HIV, especialmente los que están en etapas avanzadas, y los pacientes con fibrosis quística tienen riesgo de adquirir infecciones por *P. aeruginosa* extrahospitalaria. Las infecciones por *Pseudomonas* pueden aparecer en muchos sitios anatómicos, entre ellos, la piel, los tejidos subcutáneos, el hueso, los oídos, los ojos, las vías urinarias, los pulmones y las válvulas cardíacas. El sitio afectado varía según la puerta de entrada y la susceptibilidad del paciente. En pacientes internados en el hospital, el primer signo puede ser una septicemia abrumadora por gramnegativos (Strateva y Yordanov 2009).

Klebsiella pneumoniae

Es una bacteria anaeróbica facultativa, gramnegativa, que no produce esporas y que tiene forma de bacilo. Pertenece al grupo de los coliformes, bacterias comunes de flora gastrointestinal de los seres humanos y de otros vertebrados. Fermenta la lactosa con formación de gas en 48 horas. Esta especie puede desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno libre, por lo que se considera una especie anaeróbica facultativa. Puede sobrevivir en pH alcalino pero no en pH ácido, el desarrollo óptimo ocurre en un medio con pH neutro. Su temperatura de desarrollo está entre 15 y 40 °C, sin embargo en los laboratorios las cepas son cultivadas a 37 °C. Posee enzimas betalactamasas. La cápsula que lo rodea aumenta su virulencia al actuar como una barrera física para evadir la respuesta inmune del hospedero. Esta cápsula también protege la célula de la desecación (Prescott, Harley, y Klein, 2009). Implicada principalmente en infecciones nosocomiales. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de

herida quirúrgica. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), diabetes mellitus o alcohólicos (Leal, Schmalbach, Álvarez, Buitrago, Méndez y Grebo, 2006).

Escherichia coli

Es una bacteria miembro de la familia de las Enterobacterias y forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal del ser humano. No forma esporas móviles (flagelos peritricos). Miden 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo. Catalasa positivo. Oxidasa negativos. Reducen nitratos a nitritos. Producen vitamina B y K. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarreas (Mello, Ribeiro, Novaes y Poppi, 2005).

www.bdigital.ula.ve

Definición de términos

Resistencia bacteriana

La resistencia a antimicrobianos se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos), como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo (Sussmann, Mattos, y Restrepo, 1998).

Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia se expresan por genes para bombas de eflujo, mutaciones que modifican el sitio de acción de los antimicrobianos, producción de β -

lactamasas y disminución de la permeabilidad al antibiótico (Farra, Islam, Strålfors, Sörberg y Wretlind, 2008).

Antibiogramas

El estudio de la sensibilidad a antimicrobianos de las diferentes bacterias aisladas en muestras biológicas tiene 2 objetivos fundamentales: guiar al clínico en la elección del mejor tratamiento individual, y monitorizar la evolución de la resistencia bacteriana con objeto de revisar el espectro del antimicrobiano (Sham, 1996).

Metabolismo secundario

El metabolismo secundario compromete aquellos procesos químicos que son únicos para una planta dada, y no son universales. Dicho metabolismo es la química que conduce a la formación de un producto natural. Algunas porciones de esta química son comunes para un número de plantas diferentes o familias de plantas, pero actualmente la química de productos naturales es usualmente diferente de una planta a otra. Precursores químicos comunes pueden conducir a resultados diferentes (Ávalos, Pérez, y Carril, 2009).

Productos naturales

Los productos naturales orgánicos son sustancias derivadas del metabolismo secundario de los organismos vivos, las cuales generalmente participan directamente en los mecanismos de defensa y supervivencia. De ahí que también se les denomine “metabolitos secundarios”. Estas sustancias no están involucradas en el metabolismo “basal” o primario, en el cual se involucran azúcares, lípidos, proteínas y glicéridos, entre otras sustancias (Delgado, y col. 2001).

Operacionalización de las Variables

Las variables son elementos o factores que pueden ser clasificados en una o más categorías. Es posible medirlas o cuantificarlas, según sus propiedades o características (Palella y Martins, 2012). Algunos autores señalan que la variable es algo que "cambia" o que puede asumir diferentes valores en un momento o situación determinada. Por su parte, Arias (2012), la define como "la variable es una característica o cualidad; magnitud o cantidad, que puede sufrir cambios, y que es objeto de análisis, medición, manipulación o control en una investigación". Sin embargo, aun cuando la palabra "operacionalización" no aparece en la lengua hispana, este tecnicismo se emplea en investigación científica para designar al proceso mediante el cual se transforma la variable de conceptos abstractos a términos concretos, observables y medibles, es decir, dimensiones e indicadores. Por ejemplo, la variable actitud no es directamente observable, de allí que sea necesario operacionalizar o traducirla en elementos tangibles y cuantificables (Arias, 2012).

En tal sentido, las variables de esta investigación fueron: actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie *Citrus sinensis* L. (variable dependiente) y la composición química del aceite esencial de la especie *Citrus sinensis* L. (variable independiente). Este proceso se realizó considerando los siguientes elementos: variable, tipo de variable, definición de conceptos, definición operacional, dimensiones e indicadores que se describen en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Operacionalización de la variable dependiente

1. Variable	2. Tipo	3. Definición de conceptos
<p>Actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de la especie <i>Citrus sinensis</i> L.</p>	<p>Dependiente</p>	<p>La actividad antibacteriana de los diferentes componentes presentes en los aceites esenciales se conoce como la capacidad inhibitoria frente al crecimiento de microorganismos patógenos. (Bassolé y Juliani, 2012)</p>
4. Definición operacional	5. Dimensiones	6. Indicador
<p>Técnica de difusión en agar con discos (Kirby-Baüer).</p>	<p>Bacterias grampositivas: <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. Bacterias gramnegativas: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.</p>	<p>Tamaño del halo de inhibición del crecimiento bacteriano en milímetros (mm).</p>

Elaborado por: Cubillan, 2020

Tabla 7. Operacionalización de la variable independiente

1. Variable	2. Tipo	3. Definición de conceptos
Composición química del aceite esencial de las hojas de la especie <i>Citrus sinensis</i> L.	Independiente	Los aceites esenciales, son compuestos volátiles provenientes del metabolismo de las plantas, y contienen las sustancias responsables del aroma de las mismas. Dependiendo de la especie, los aceites esenciales pueden tener entre 50 a 300 compuestos químicos, los cuales pertenecen a los grupos de hidrocarburos terpénicos (monoterpenos y sesquiterpenos) (Moreno, Crescente, Ortiz y Quintero, 2006).
4. Definición operacional	5. Dimensiones	6. Indicador
Técnica Cromatografía de gases-espectrometría de masas.	La cromatografía de gases (CG), La espectrometría de masas (EM)	El tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos y cuantificación de todos los componentes. Composición de elementos químicos e isotopos atómicos en función de la relación carga/masa.

Elaborado por: Cubillan, 2020

Hipótesis

La especie *Citrus sinensis* L., ha sido usada como planta medicinal en diferentes partes del mundo, del aceite esencial de esta especie se ha reportado el aislamiento de metabolitos derivados de los terpenoides, tales como monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos oxigenados, que han presentado gran variedad de actividades biológicas; en tal sentido se presume que el aceite esencial de las hojas de *Citrus sinensis* L. del estado Mérida Venezuela, presenta metabolitos secundarios similares y los mismos sean activos frente a las bacterias ATCC grampositivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, y tres gramnegativas: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

El tipo de investigación se refiere a la clase de estudio que se va a realizar. Orienta sobre la finalidad general y sobre la manera de recoger las informaciones o datos necesarios. En tal sentido, los tipos de investigación pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa (Hurtado, 2008). Por lo que esta investigación es de tipo confirmatoria, ya que en ella se desea confirmar la relación que existe entre la composición química del aceite esencial de la especie *Citrus sinensis* L. y su actividad antibacteriana.

Diseño de Investigación

El diseño de investigación es la estrategia general que adopta el investigador para responder al problema planteado. En atención al diseño, la investigación se clasifica en: documental, de campo y experimental (Palella y Martins, 2012). Adicionalmente el diseño tiene relación en el dónde y el cuándo se recopiló la información necesaria y la amplitud de la misma, con el fin de responder las interrogantes planteadas (Hurtado, 2015). Al respecto, esta investigación se clasifica como diseño de investigación experimental, que según Arias (2006), “la investigación experimental es un proceso que consiste en someter a un objeto o grupo de individuos, a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento (variable independiente), para observar los efectos o reacciones que se producen (variable dependiente)”. Puesto que, los datos

de esta investigación serán sometidos a un proceso experimental, y se obtienen al evaluar la composición química del aceite esencial de las hojas de la especie *Citrus sinensis* L., junto a la actividad antibacteriana, la cual se mide, mediante la técnica de difusión en agar con disco (Kirby-Bauer).

Población y Muestra

Unidad de Investigación

Una unidad de investigación es un individuo o un grupo de individuos que reúnen atributos o características similares y se define en función de los objetivos de la investigación (Arias, 2006). La unidad de investigación de este estudio estuvo constituida por la especie *Citrus sinensis* L. perteneciente al género *Citrus* de la familia de las Rutáceas, la cual se obtuvo de la localidad de Santa Elena de Arenales del Municipio Obispo Ramos de Lora, Estado Mérida, Venezuela

Selección del tamaño de la muestra

La muestra es un subconjunto representativo y finito que se extrae de la población accesible (Arias, 2006). Para la extracción del aceite esencial se utilizó un kilogramo (1 Kg) de hojas frescas de la planta de *Citrus sinensis* L.

Sistema de Variables

Una variable es una cualidad susceptible de sufrir cambios. Un sistema de variables consiste, en una serie de características por estudiar, definidas de manera operacional, es decir, en función de sus indicadores o unidades de medida (Arias, 2006).

En este estudio se consideró el siguiente sistema de variables:

- **Variable Dependiente:** Actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de la especie *Citrus sinensis* L.
- **Variable Independiente:** Composición química del aceite esencial de las hojas de la especie *Citrus sinensis* L.

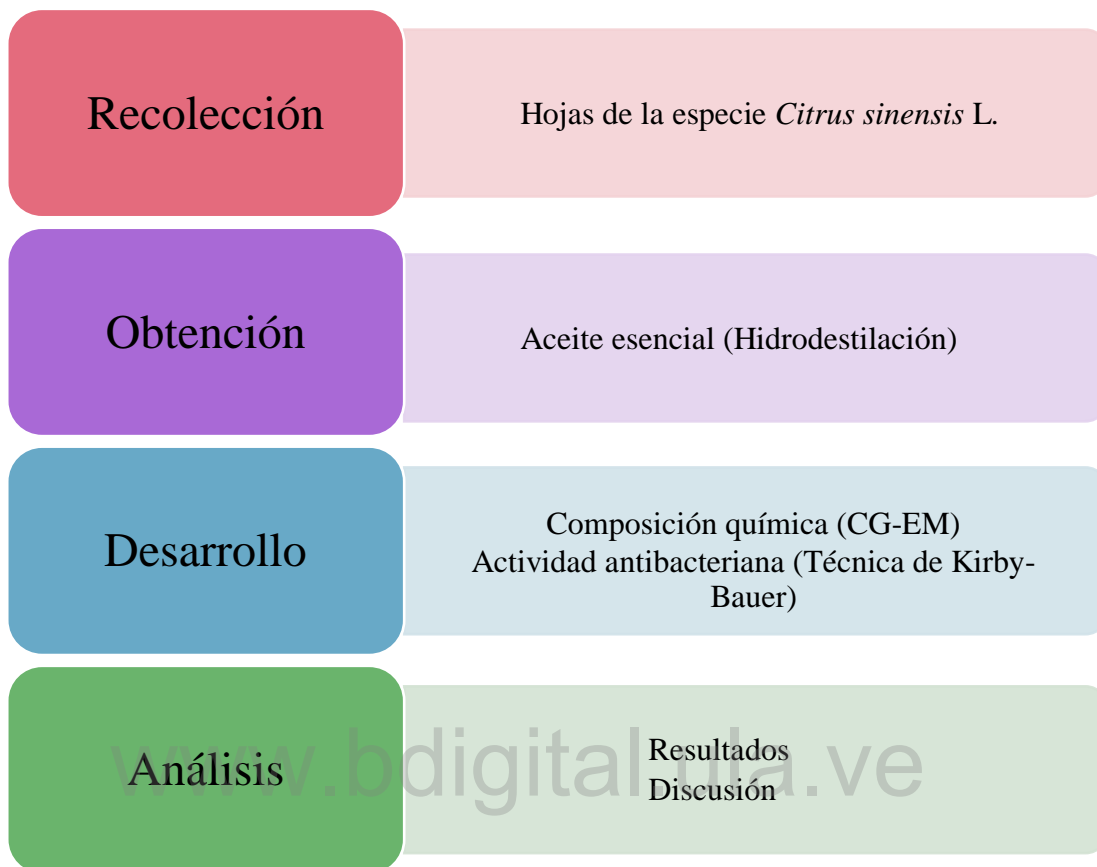
Instrumento de Recolección de Datos

Las técnicas de recolección de datos según Arias (2006) los instrumentos son cualquier recurso, dispositivo o formato en papel o digital, que se utiliza para obtener, registrar o almacenar la información. Entre los cuales se pueden mencionar: los cuestionarios entrevistas y otros. En este estudio, el instrumento de recolección de datos se adapta al diseño de investigación, por ende, es la observación directa de los datos obtenidos en el laboratorio.

Procedimientos de la Investigación

Siendo este un medio simple de efectividad para localizar la información de una investigación, se diseña un paso a paso a seguir (Esquema 1), para alcanzar el éxito de los objetivos planteados. Según Hernández, Fernández y Baptista, (2010) se entiende que son procesos dinámicos, cambiantes y continuos, compuestos por una serie de etapas, las cuales se derivan unas de otras. El proceso de investigación es un sistema que se desarrolla en etapas, la siguiente afecta a la anterior, pero a la vez da origen a otra.

Esquema 1. Procedimientos de la investigación



Recolección de la muestra

La muestra se recolectó en la finca Caño Rico, ubicada en el sector Caño Rico de la localidad de Santa Elena de Arenales del Municipio Obispo Ramos de Lora, Estado Mérida, fue procesada en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Obtención del aceite esencial

La obtención del aceite esencial de la especie *Citrus sinensis* L., se llevó a cabo mediante el método de hidrodestilación. Es una clase de destilación con arrastre de vapor aplicado generalmente para la obtención de extractos y aceites esenciales. Consiste en un recipiente que contiene tanto el material a ser extraído como el solvente empleado en la extracción, generalmente agua, un sistema de calentamiento permite agregar energía al recipiente lo que incrementa la temperatura del solvente hasta alcanzar la temperatura de ebullición. A medida que la temperatura del solvente aumenta, los metabolitos de interés contenidos en las células del material extraído migrarán del seno del material hacia el solvente. Los componentes volátiles comenzarán a evaporarse en equilibrio con el vapor del solvente. El vapor generado en el recipiente de extracción es conducido a través de uniones de vidrio o metal a un condensador donde el vapor pasa a fase líquida gracias al intercambio de calor con un agente refrigerante, generalmente se emplea agua corriente. El condensado es conducido a un recipiente de almacenamiento donde la diferencia de densidades entre el aceite esencial y el líquido de extracción permite la separación (Bandoni, 2000).

Determinación de la Composición Química del Aceite Esencial

La composición química, se determinó mediante el método de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM). El mismo, combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva de la espectrometría de masas. Esta combinación es la que permite analizar y cuantificar compuestos trazados en mezclas complejas con un alto grado de efectividad (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial

Para la detección de la actividad antibacteriana se empleó la técnica de difusión en agar con discos (Kirby-Bauer), que es un estudio de susceptibilidad por difusión en disco.

Método de Difusión en Agar o Kirby-Baüer

Es un estudio de susceptibilidad por difusión en disco. Un disco que tiene una cantidad específica de antimicrobiano, el cual es aplicado a una superficie de agar inoculado con un microorganismo. El antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano (Taroco, Seija y Vignoli, 2008).

Pasos de Técnica de Difusión en Agar o Kirby-Bauer

Preparación del pre-inóculos bacteriano: La estandarización del inóculo es vital para realizar pruebas de susceptibilidad precisa y reproducible. Las cepas a ensayar se incubaron en agar Mueller Hinton a 37 °C por 16 a 18 horas antes de hacer ensayo microbiano, ya que es el tiempo donde las bacterias adquieren los nutrientes para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano (Anon, 2003).

Preparación del inóculo bacteriano: Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas, se diluyó en solución salina estéril al 0,85 % una pequeña cantidad de colonias hasta obtener una turbidez visualmente comparable al patrón McFarland N° 0.5 (10^{6-8} UFC / mL).

Preparación de las placas: A cada placa se le colocó 20 mL de agar Mueller Hinton previamente preparado y esterilizado a una temperatura no superior a 40 °C, posteriormente se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Preparación de los discos: Se emplearon discos de papel de filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda la noche. Previo a la preparación del inóculo se impregnaron los discos con 10 µL del aceite esencial (Velasco, y col., 2007). También se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo descritos en la tabla 8, con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar; y como control negativo discos impregnados con 10 µL del solvente dimetil sulfoxido (DMSO).

Inoculación e incubación de las placas: El inóculo se extendió sobre placas de agar donde se colocaron los discos de papel de filtro (6 mm) saturados con 10 µL de aceite esencial. Las placas se dejaron 30 min a temperatura ambiente y luego se incubaron a 37 °C durante 24 h. La zona inhibitoria alrededor del disco se midió y expresó en mm. También se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar (Tabla 8).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 8. Antibióticos comerciales utilizados como control positivo en el estudio de la actividad antibacteriana

Bacterias ATCC	Antibióticos comerciales		
	Eritromicina (E) (15 µg)	Ampicilina (AMP) (10 µg)	Piperacilina (PIP) (100 µg)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	32 mm	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	32 mm	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	27 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	27 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	27 mm

Diseño de Análisis

Los datos recolectados en la fase interactiva del proceso de investigación fueron analizados a través de un enfoque cuantitativo y cualitativo, ya que se expresan numéricamente a los cuales se les realizaron descripciones u observaciones. No fueron analizados a través de técnicas estadísticas.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Obtención y rendimiento del aceite esencial

Por el método gravimétrico – volumétrico se determinó el porcentaje de rendimiento del aceite esencial de la especie (%RAE) *Citrus sinensis* L. con la siguiente expresión:

$$\% \text{ RAE} = \text{Vol}_{\text{AE}}(\text{mL}) / \text{Peso}_{\text{mx}}(\text{g}) \times 100$$

$\text{Vol}_{\text{AE}}(\text{mL})$: volumen obtenido de aceite esencial

$\text{Peso}_{\text{mx}}(\text{g})$: peso del material vegetal fresco colocado en el equipo de hidrodestilación

El aceite esencial de la especie *Citrus sinensis* L. se obtuvo mediante hidrodestilación, a partir de las hojas de la planta donde se empleó 1000 gramos y se obtuvo 1,4 mL de aceite; por lo que el % RAE del aceite fue de 0,14%.

Análisis de la composición de la química

El análisis de la composición química fue evaluado a través de Cromatografía de Gases acoplada con Espectrometría de Masas, el cual arrojó un total de 19 componentes descritos en la tabla 9.

Tabla 9. Componentes químicos encontrados en el aceite esencial de *Citrus sinensis* L.

N° Pico	Tiempo de retención	%Área	Compuesto
1	3,691	1,08	<i>cis</i> -3-hexen-1-ol
2	5,106	1,54	α -Pineno
3	5,992	39,50	β-Felandreno
4	6,066	1,80	β -Pineno
5	6,339	3,28	Mirceno
6	6,712	0,73	α -Felandreno
7	6,869	9,95	Δ- 3-Careno
8	7,018	1,18	α -Terpineno
9	7,349	4,50	Limoneno
10	7,349	4,50	<i>trans</i>-Ocimeno
11	8,168	1,78	γ -Terpineno
12	9,029	1,98	α -Terpineol
13	9,377	10,76	Linalool
14	10,982	1,83	Citronelol
15	11,801	5,14	Terpineno-4-ol
16	13,382	1,49	No identificado
17	13,804	1,07	No identificado
18	14,747	1,23	No identificado
19	47,866	0,88	No identificado

Los resultados demostraron que el aceite esencial está constituido principalmente por β -felandreno (39,50 %), Linalool (10,76 %), Δ -3-careno (9,95 %), Terpineno-4-ol (5,14 %), limoneno (4,50 %) y *trans*-careno (4,50 %) y con un porcentaje menor (3,42 %) otros compuestos volátiles (figura 4 y figura 5).

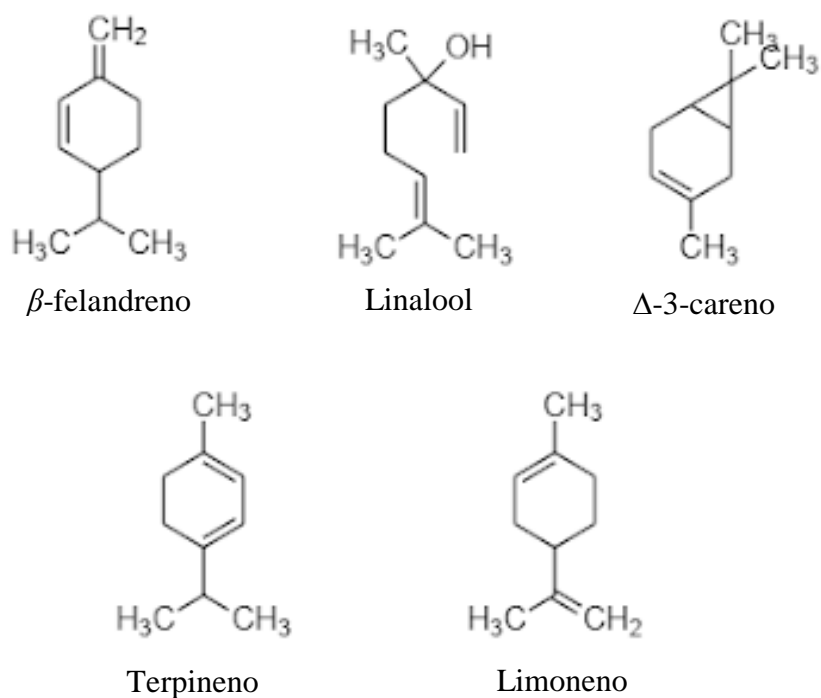


Figura 4. Principales componentes volátiles encontrados en el aceite esencial de la especie *Citrus sinensis* L.

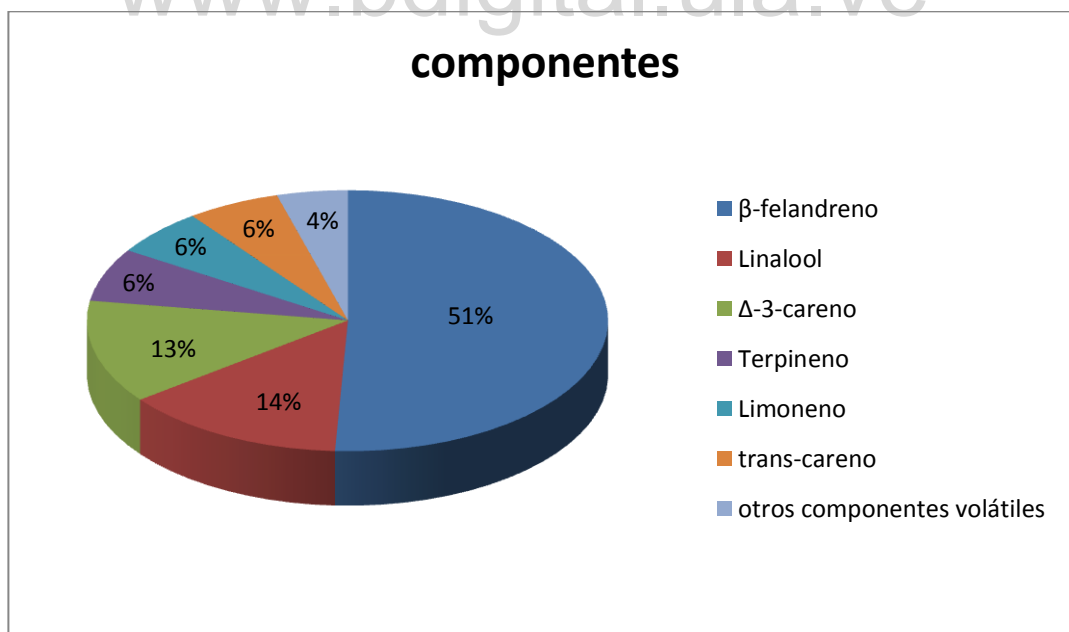


Figura 5. Componentes mayoritarios del aceite esencial de las hojas de la especie *Citrus sinensis* L.

Determinación de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana del aceite esencial puro de las hojas de la especie *Citrus sinensis* L., se evaluó mediante la técnica de difusión de disco en agar o Kirby-Bauer, frente a cinco bacterias: dos grampositivas (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y tres gramnegativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), donde se observaron halos de inhibición en cada una de las placas, descritos en la tabla 10, mostrando que el aceite presentó un amplio espectro contra los microorganismos estudiados (Anexos 1 y 2).

Tabla 10. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie *Citrus sinensis* L.

Microorganismo	Controles				AE puro de las hojas de <i>C. sinensis</i> L.
	Positivos			Negativo	
	E (15 µg)	AMP (10 µg)	PIP (100 µg)	dimetil sulfoxido (DMSO)	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	32 mm	-	-	15 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	32 mm	-	-	-	15 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	27 mm	-	17 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	27 mm	-	20 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	27 mm	-	10 mm

Discusión

El análisis cromatográfico del aceite esencial de las hojas *Citrus sinensis* L. arrojó un total de 19 componentes que resultaron ser una mezcla de terpenos, de los cuales, los monoterpenos fueron los componentes de mayor presencia en el aceite, siendo el β -felandreno el de mayor concentración (39,50 %), y en proporciones más bajas el linalool, Δ -3-careno, terpineno, limoneno y *trans*-careno.

Al comparar los resultados obtenidos (Tabla 9) de la composición química del aceite esencial de las hojas de *Citrus sinensis* L. con estudios anteriores, resultó ser similar para la misma especie recolectada en diferentes países en cuanto al predominio de los monoterpenos.

Por otra parte, estos resultados se compararon con otros estudios encontrándose que no hubo semejanza en los componentes de dichos aceites; al respecto, Matuka y col (2020) utilizaron cascaras, hojas frescas y secas de la planta donde encontraron componentes mayoritarios como sabineno y terpinen-4-ol en las hojas frescas y β -elemeno y sabineno en las hojas secas. Por otra parte, Lui y col. (2018) utilizaron las cortezas, hojas y flores de la especie, encontrando que el aceite de las hojas estaba constituido por sabineno, limoneno, linalool y citronelal; a diferencia de esta investigación en donde se utilizaron las hojas y como componentes mayoritarios se encontraron el β -felandreno, linalool, Δ -3-careno, terpineno, limoneno y *trans*-careno.

Además se comparó con otros estudios de autores como: Castañeda y col. (2018); Bozkurt y col (2017); Geraci y col (2016); Družić y col (2016), ellos evaluaron la composición química de la especie *Citrus sinensis* L. y de otras especies del género *Citrus*, utilizando las cascaras de las frutas para la obtención de los aceites esenciales, en los cuales, el componente mayoritario fue el limoneno seguido de otros monoterpenos y sesquiterpenos en porcentaje más bajos a diferencia también de este estudio.

En cuanto a la actividad antibacteriana en el ensayo realizado el aceite esencial de las hojas *Citrus sinensis* L., a pesar de que este no arrojó componentes similares a los de las investigaciones anteriores, si presentó inhibición en cepas bacterianas.

Existen estudios que respaldan la actividad antibacteriana que presentan los componentes mayoritarios que se encontraron en el aceite esencial de la especie en estudio; sin embargo estos compuestos han sido aislados de plantas que no pertenecen a la familia de las Rutáceas. En tal sentido, Buitrago, Velasco, Díaz y Morales, (2012), en su estudio, el aceite esencial de *Monticalia imbricatifolia* Schultz (Asteraceae), los componentes mayoritarios fueron los monoterpenos: α -felandreno (33,89 %), β -felandreno (19,28 %), α -pineno (16,81 %) y β -pineno (10,97 %), donde la actividad antibacteriana del aceite esencial de esta especie fue evaluada por la técnica de difusión en agar con discos contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (30 mm), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) (23 mm), *Escherichia coli* (ATCC 25922) (21 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (17 mm) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) (15 mm), mostrando un amplio espectro de actividad contra importantes patógenos humanos a bajas concentraciones inhibitorias mínimas (CIM 20-60 μg / ml).

Por otra parte, Aparicio, Rojas, Velasco, Usubillaga, Sosa, y Rojas (2019), realizaron un estudio del aceite esencial de las hojas de *Libanothamnus neriifolius* (Asteraceae)", en dicho aceite esencial se identificaron como compuestos principales β -felandreno (29,04 %), α -felandreno (19,86 %), α -pineno (13,57 %) y α -tujeno (12,35 %). La actividad antimicrobiana del aceite esencial de la especie se determinó por el método de difusión en agar con discos frente a los microorganismos patógenos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* CDC-B385, *Candida krusei* ATCC 6258; siendo efectivo contra el desarrollo de *S. aureus*, *C. albicans* y *C. krusei* con valores de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 700 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente, actividad que podría atribuirse al alto contenido de monoterpenos hidrocarbonados. Por lo que se puede relacionar que la actividad

antibacteriana presentada por el aceite esencial de las hojas de *C. sinensis* en este estudio, se debe a la presencia mayoritaria de esta clase de terpenoides como lo son los monoterpenos.

Son escasos los estudios sobre la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de las hojas de la especie *Citrus sinensis* L.; por lo que al evaluarse en este estudio tanto sus componentes químicos como su actividad antibacteriana se obtuvieron resultados favorables en la especie recolectada en Mérida Venezuela-, ya que, se dio a conocer que posee componentes distintos a los encontrados en los aceites de la especie *Citrus sinensis* o de otras especies del género *Citrus* en diferentes partes; asimismo, al evaluarse la actividad antibacteriana se obtuvo un resultado satisfactorio, ya que el aceite presentó inhibición en el crecimiento de todas las bacterias ATCC en estudio. De allí que los aceites esenciales de especies cítricas pueden llegar a ser de gran utilidad en un futuro para combatir enfermedades causadas por microorganismos patógenos, y que no solo en la corteza de sus frutos se encuentran componentes químicos con grandes cualidades biológicas.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Se obtuvo un volumen de 1,4 mL del aceite esencial de las hojas de *Citrus sinensis* L., y el mismo presentó un rendimiento de 0,14%.

De acuerdo al análisis cromatográfico y de espectrometría de masas del aceite esencial de las hojas de *Citrus sinensis* L se lograron identificar 19 compuestos, el componente mayoritario resultó ser el β -felandreno (39,50 %) , seguido del linalool (10,76 %), Δ -3-careno (9,95 %), terpineno-4-ol (5,14 %), limoneno (4,50 %) y *trans*-careno (4,50 %), siendo en sus mayoría monoterpenos.

Se evaluó la actividad antibacteriana del aceite esencial puro de las hojas de la especie *Citrus sinensis* L., observándose una buena sensibilidad frente a los microorganismos ensayados: bacterias grampositivas *Enterococcus faecalis* (15 mm), *Staphylococcus aureus* (15 mm) y gramnegativas *Escherichia coli* (17 mm), *Klebsiella pneumoniae* (20 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (10 mm).

Recomendaciones

Extraer y separar los principios activos de las diferentes partes de la especie *Citrus sinensis* L. y evaluar su actividad antibacteriana.

ANEXOS

Anexo 1

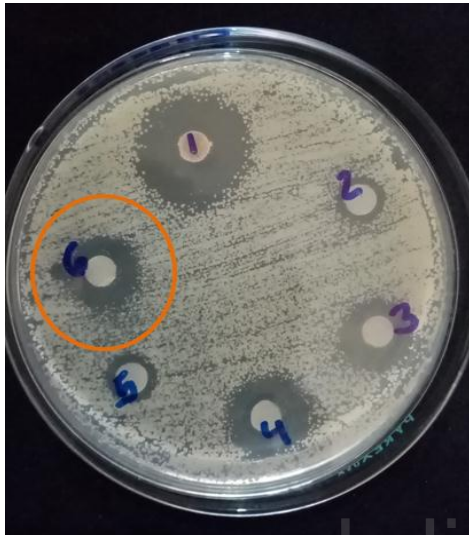


Figura 6. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Citrus sinensis* L. frente a *Enterococcus faecalis*



Figura 7. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Citrus sinensis* L. frente a *Staphylococcus aureus*

Anexo 2

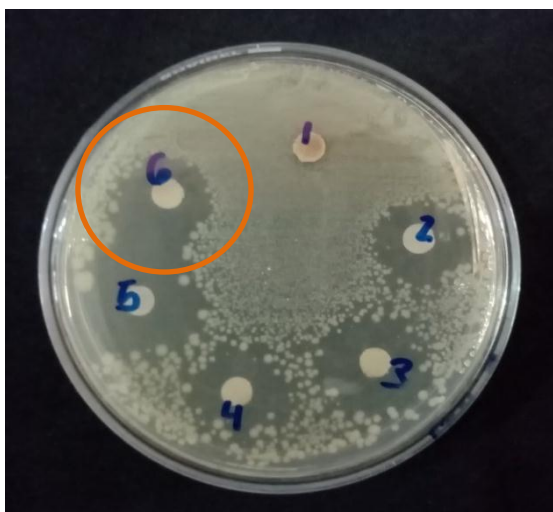


Figura 8. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Citrus sinensis* L. frente a *Escherichia coli*



Figura 9. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Citrus sinensis* L. frente a *Klebsiella pneumoniae*



Figura 10. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Citrus sinensis* L. frente a *Pseudomonas aeruginosa*

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Albarracín, M. y Gallo, P. (2003). *Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando Piper aduncum (cordoncillo) procedente de la zona cafetera*. (Trabajo de grado). Universidad Nacional de Colombia.
- Anaya, A., Macias, M., Cruz, O., Sánchez, M., Hernandez, B., y Mata, R. (2005). Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Phytochemistry*, 66 (4), 487-494.
- Anon, (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology of Infection*, 9 (8), 1-7.
- Aparicio, R., Rojas, L., Velasco, J., Usubillaga, A., Sosa, M. y Rojas, J. (2019). Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Libanothamnus nerifolius* (Asteraceae). *Revista Peruana de Biología*, 26 (1), 095-100.
- Arias, F. (2006). *El Proyecto de investigación*. Introducción a la metodología científica. Caracas, Venezuela. Editorial EPISTEME.
- Arias, F. (2012). *El Proyecto de investigación*. Introducción a la metodología científica. Caracas, Venezuela. Editorial EPISTEME.
- Ashurt, P. (1999). Essential oils by J. Wright (Ed.), *Food Flavorings*. Aspen, EEUU: Chapman & Hall. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/877/87701214.pdf> .
- Ávalos, A., Pérez, E. y Carril, U. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2 (3), 119-145.
- Bandoni, A. (2000). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica*. Buenos Aires-Argentina. Editorial Argentina.

- Barber, M., Bordoli, R., Sedgwick, R. y Tyler, A. (1981). Fast atom bombardment of solids (FAB): a new ion source for mass spectrometry. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 7(7), 325-327. Recuperado de: <https://core.ac.uk/download/pdf/60886376.pdf>
- Bassolé, I. y Juliani, R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Journal Molecules*, 17(4), 3989-4006.
- Beñatena, H. 1972. *Clasificación Botánica de los Citrus Cultivados*. Recuperado de: file:///D:/Downloads/Los_citricos_1_CAPITULO_I_LOS_CITRICOS.pdf
- Bernácer, R. (2011). La naranja, la fruta reina del invierno. *Revista de Salud y Bienestar*, 61(1), 59-68. Recuperado de: <https://www.webconsultas.com/dieta-y-nutricion/saber-comprar/la-naranja-la-fruta-reina-del-invierno-2370>
- Bozkurt, T., Gülnaz, O., y Aka Kaçar, Y. (2017). Chemical composition of the essential oils from some citrus species and evaluation of the antimicrobial activity. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 11 (10), 01-08.
- Bruneton, J. (2005). *Farmacognosia, Fitoquímica y Plantas Medicinales*. Caracas-Venezuela. 2^{da} edición. Editorial ACRIBIA, S.A.
- Buitrago, D., Velasco, J., Díaz, T. y Morales, A. (2012). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the *Monticalia imbricatifolia* Schultz (Asteraceae). *Revista Latinoamericana de Química*, 40 (1), 13-18.
- Caballero, B., Finglas, P., y Trugo, L. (2003). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. [versión electrónica]. London, Inglaterra: Academic Press.
- Can, B. K. H., y Buchbauer, G. (2015). *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Application*. Florida, Estados Unidos .Taylor & Francis Group.
- Cañate, M. (2010). *Uso Industrial de Plantas Aromaticas y Medicinales*. Madrid, España. Ediciones OCW-UPM.

- Casas, J., García, J., Guadayol, J. y Olivé, J. (1994). *Análisis instrumental II: Cromatografía y electroforesis*. Recuperado de: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf>
- Castañeda, D., Rivera, T., Choy, F., Munguía, P., Portillo, R. y Muñoz, J. (2018). Actividad antimicrobiana del aceite de naranja residual. *Centro de investigaciones UNED Research Journal*, 10 (2), 469-474.
- Costa, R., Bisignano, C., Filocamo, A., Grasso, E., Occhiuto, F. y Spadaro, F. (2014). Antimicrobial activity and chemical composition of *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle essential oil from Italian organic crops. *Journal of Essential Oil Research*, 26 (6), 400-408.
- Cowan, S., y Smith, B. (1973). Rutáceas. En R. Reitz (ed.), *Flora Ilustrada Catarinense*. Fasc. RUTA: 1-89. Itajai, Brasil: Herbario “Barbosa Rodriguez”.
- Daza, R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica de Sistema Nacional de Salud*, 22(3), 57-66. Recuperado de: <http://www.mspci.es/fr/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
- Dabbah, R., Edwards, M. y Moats, A. (1970). Antimicrobial Action of Some Citrus Fruit Oils on Selected Food-Borne Bacteria. *Appl Microbiol*, 19(1), 27-31.
- Delgado, G., Olivares, M., Chávez, T., Ramírez, E., Linares, R., Bye y Espinosa, G. (2001). Natural Products. *Journal of Natural Products*, 64(1), 861-864.
- Družić, J., Jerković, I., Marijanović Z., y Roje, M. (2016). Chemical biodiversity of the leaf and flower essential oils of *Citrus aurantium* L. from Dubrovnik area (Croatia) in comparison with *Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Washington navel, *Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Tarocco and *Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Doppio Sanguigno. *Journal of Essential Oil Research*, 28(4), 283-291.
- Escalante, G. 1961. El género *Fagara* en la Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, (IX), 291-318.

- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Production. Disponible en: <[http:// FAO.fao.org/site/339/default.aspx](http://FAO.fao.org/site/339/default.aspx)>. Acceso en: 27/04/11. 2011. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/233933416_Consideraciones_sobre_la_produccion_de_frutas_en_Venezuela
- Fuentes V. y Granda M. (1997). *Conozca las plantas medicinales*. La Habana, Cuba: Editorial Científico-Técnica, 1997-244. Recuperado de: https://www.ecured.cu/uso_de_plantas_medicinales
- Geraci, A., Di Stefano, V., Di Martino, E., Schillaci, D. y Schicchi, R. (2016). Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity. *Natural Product Research*, 31(6), 653-659.
- Gmitter, F. y Hu, X. (1990). The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (rutaceae). *Economic Botany*, 44 (2), 267-277. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02860491>
- Guerra, L., Soto, L., Medina, Z., Ojeda, G. y Peña, J. (2014). Actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus sinensis*) var. Valencia frente a microorganismos grampositivos y gramnegativos. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 31(2), 215-232.
- Gutiérrez, M. y Droguet, M. (2002). Identificación de compuestos volátiles por cromatografía de gases - espectrofotometría de masas. *Boletín Intexter (U.P.C)*. Recuperado de: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf>
- Harris, G., Foster, J. y Richards, G. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European Cells and Materials Journal*, 31 (4), 39-60.

- Heneka, B, Rimpler, H., Ankli, A., Sticher, O., Gibbons, S. y Heinrich, M. (2005). A furanocoumarin and polymethoxylated flavonoids from the Yucatec Mayan plant *Casimiroa tetrameria*. *Phytochemistry*, 66(6), 649-52.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación*. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Hurtado, J. (2008). *El proyecto de investigación: comprensión holística de la metodología y la investigación*. Caracas-Venezuela. Editorial Quirón, Sypal.
- Hurtado de B.,J. (2015). *El proyecto de investigación: Comprensión holística de la metodología y la investigación* (8ª. Ed). Caracas, Venezuela: Quirón.
- Hutchinson, J. (1982). *Clave mundial para las familias de plantas con flores*. Tucumán, Argentina. Miscelánea Fundación Miguel Lillo. Recuperado de: https://books.google.co.ve/books/about/Clave_mundial_para_las_familias_de_plant.html?id=b1rLZwEACAAJ&redir_esc=y
- Irkin, R. y Kizilirmak, O. (2015). Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. *J. The Journal of Food Science and Technology*, 52 (10), 6095-6111.
- Juárez J, Castro A, Jaúregui J, Lizano J, Carhuapoma M, Choquesillo, F., Félix, L., Cotillo, P., López, J., Jaramillo, M., Córdova, A., Ruíz, J. y Ramos., N. (2011). Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (Naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos del Perú. *Revista Ciencia e Investigación*, 13 (1), 9-13 Edición electrónica: ISSN 1609-9044
- Kloss, E., Schleir, H. y Goirtz, F. (1992). The genus *Staphylococcus*. In: Balows, A., Truper, H. G. y Dwoekin, M., (Ed). *The Prokaryotes*. New York, Springer-Verlag. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>

- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I. y Baba, T. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 357(7), 1225-1240. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- Kuzovkina, I., Al'terman, I. y Schneider, B. (2004). Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 65(8), 1095-100.
- Lawrence, H. (1951). *Taxonomy of Vascular Plants*. New York, EEUU: The Macmillan Company
- Leal, A., Schmalbach, J., Álvarez, C., Buitrago, G., Méndez, M., y Grebo (2006). Canales endémicos y marcadores de resistencia bacteriana, en instituciones de tercer nivel de Bogotá, Colombia. *Salud Pública*. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1805/180518994006.pdf>
- León G. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 49 (4), 742-750. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v49n4/far14415.pdf>
- Liu, K., Deng, W., Cao, S., y Chun, J. (2018). Chemical composition of peel, leaf and flower essential oils from 'Newhall' and 'Gannanzao' navel oranges. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 6 (3), 35-39. Recuperado de: <https://www.essencejournal.com/pdf/2018/vol6issue3/PartA/5-5-13-994.pdf>
- Luna, H. (2007). *Obtención, caracterización y estudio de la desterpenación del aceite esencial de la naranja (Citrus sinensis)* (trabajo de grado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. Recuperado de: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/6264/2/122629.pdf>
- Macbride, F. (1949). Rutaceae in Flora of Peru: In Botanical Series Field. *Museum of Natural History*, 8(3), 655-689. Recuperado de: https://fcf.unse.edu.ar/archivos/quebracho/q8_05-Miranda.pdf

- Martínez, V. (2016). *Citrus aurantium, naranjo amargo*. Puerto Rico. Botánica online. Recupero de: <http://www.botanical-online.com/fotocitrusaurantiumcastella.htm#>
- Martínez, Y. y Gómez, L. (2013). Impacto social de una estrategia de intervención sobre prescripción racional de medicina verde en Céspedes durante 2011. *Revista Cubana Plantas Medicinales*, 18 (4), 609-18.
- Matuka, T., Oyedeji, O., Gondwe, M. y Oyedeji, A. (2020). Chemical Composition and In vivo Anti-inflammatory Activity of Essential Oils from *Citrus sinensis* (L.) osbeck Growing in South Africa. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(4), 638-647.
- Mello, C., Ribeiro, D., Novaes, F. y Poppi, J. (2005). Rapid differentiation among bacteria that cause gastroenteritis by use of low-resolution Raman spectroscopy and PLS discriminant analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383 (4), 701-706.
- Moreno, S., Crescente, O., Ortiz, S. y Quintero, M. (2006). Composición química y actividad tóxica del aceite esencial de *Simsia pubescens* Triana. *Revista Interciencia*, 31(10), 0378-1844.
- Obidi, F., Adelowotan, O. Ayoola, A, Johnson, O., Hassan, O. y Nwachukwu, C. (2013). Antimicrobial activity of orange oil on selected pathogens. *The International Journal of Biotechnology*, 2(6), 113-122. Recuperado de: [http://www.aessweb.com/pdf-files/ijb%20\(6\),%20113-122.pdf](http://www.aessweb.com/pdf-files/ijb%20(6),%20113-122.pdf)
- Olano, M., Ochoa, M., Salirrosas, J., y Vásquez, A. (2014). *Resistencia bacteriana inducida por antibióticos* (Trabajo de Investigación). Universidad Nacional Federico Villarreal, Perú, Lima. Recuperado de: https://www.academia.edu/9626006/Inducci%C3%B3n_a_la_resistencia_antibi%C3%B3ticos

- Organización Mundial de la Salud OMS. (citado: 02 de Marzo del 2020). Medicina tradicional: definiciones Recuperado de: https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
- Organización Mundial de la Salud OMS. (citado: 31 de Julio de 2020). Resistencia a los antibióticos. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%0B3ticos>
- Palella, S. y Martins, F. (2012). *Metodología de la Investigación Cuantitativa*. Caracas, Venezuela. FEDUPE
- Parra, K. y Rivas, E. (Noviembre 2014). *Estudio comparativo de la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de Citrus sinensis y Citrus aurantifolia*. (Tesis de pregrado). Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida Venezuela
- Peix, A., Ramírez, M. y Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9 (6), 1132-47.
- Prescott, L., Harley, J. y Klein, D. (1999). *Microbiología*. Mc Graw-Hill Interamericana de España.
- Prescott, M. Harley, P. y Klein, A. (2009). *Microbiología*. Recuperado de: https://www.academia.edu/3746295/Libro_prescott
- Quiñones, D., Marrero, D., Falero, B., Tamargo, I., Llop, A. Kobayashi N. y Campo, R. (2008). Susceptibilidad antimicrobiana y factores de virulencia en especies de *Enterococcus* causantes de infecciones pediátricas en Cuba. *Revista Cubana Medicina Tropical*, 2(60). 346-357. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-0760200800020004&lng=es

- Rana, S., Juyal, P. y Rashmi, M. Blazquez, A. (2004). Chemical constituents of the volatile oil of *Murraya koenigii* leaves *International Journal of Aromatherapy*, 14 (1), 23-25.
- Ribeiro, R., Andrade, M., Ramos, N., Regiane, F., Araújo, I. y Sánchez, A. (2017). Biological activities and major components determination in essential oils intended a biodegradable food packaging. *Industrial Corps and Products*, 97 (1), 201-210.
- Sham, D. (1996). The role of clinical microbiology in the control and surveillance of antimicrobial resistance. *ASM News*, 2(62), 25-29. Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-anales-pediatria-continuada-51-articulo-el-antibiograma-interpretacion-del-antibiograma-S1696281809719274#bb0025>
- Smith, A., Stewart, J. y Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *journal of applied microbiology*, 26 (2), 118-22
- Sousa, C., Soares, P. y Santos, P. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: phenotypic flexibility and antimicrobial resistance. *Researchgate* 7 (39), 650-665.
- Sovová, H. y Slavcho, A. A. (2006). Mathematical model for hydrodistillation of essential oils, *Flavour and Fragrance Journal*, 21 (1), 881–889. Recuperado de: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4967/4035>
- Spichiger, R., y Stutz de Ortega, L. (1987). *Flora del Paraguay. Rutaceae*. Recuperado de: <https://www.nhbs.com/flora-del-paraguay-volume-8-rutaceae-book>
- Stampella, P., Delucchi, G., Keller, H. y Hurrelle, J. (2014). Etnobotánica de *Citrus reticulata* (Rutaceae, Aurantioideae) Naturaleza en la Argentina. *Revista DONPLANDIA*, 23(2), 151-162. Recuperado de:

http://ibone.unne.edu.ar/objetos/up/documentos/bonplandia/public/23_2/151_162.pdf

- Stevens, P. F. (2001). *Angiosperm Phylogeny Website*. Versión 9, June 2008. Missouri Botanical Garden. Columbia, EEUU. Recuperado de: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Strateva, T. y Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58 (9), 1133-48.
- Sussmann, P., O. A., Mattos, L. y Restrepo, A. (1998). Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. *Departamento de Biología Molecular. Salud pública mexicana*, 36 (4), 428-438.
- Taroco, R., Seija, V. y Vignoli, R. (2008). *Temas de Bacteriología y Virología Médica* Montevideo-Uruguay. Oficina del Libro FEFMUR.
- Torrenegra, M., Pájaro, G., y León, M. (2017). Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*, *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 46 (2), 160-175.
- Tortora, J., Funke, R. y Case, L. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires; Bogotá; Caracas; Madrid; México; Porto Alegre. Editorial Médica Panamericana.
- Usano, J., Palá, J. y Díaz, S. (2014). *Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana*. INRES-Horticultural Science. Universidad de Bonn. Alemania. Reduca Bióloga ISSN: 1989-3620.
- Velasco, J., Rojas, J., Salazara, P., Rodríguez, M., Díaza, T., Morales, A. y Rondón, M. (2007). Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Lippia oreganoides* Against Multiresistant Bacterial Strains of Nosocomial Origin. *Natural Product Communications*, 2 (1), 85-88.

- Viuda, M., Ruiz, Y., Fernández, J. y Pérez, J. (2013). Chemical Composition of Mandarin (*C. reticulata* L.), Grapefruit (*C. paradisi* L.), Lemon (*C. limon* L.) and Orange (*C. sinensis* L.) Essential Oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, (12), 236-243.
- Wang, S., Ju, X., Chen, X. y Hu, Z. D. (2003). Separation and determination of coumarins in the root bark of tree citrus plants by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Plantas Medicinales*, 69 (5), 483-6.
- White, B. y Foster, S. (2004). *El Recetario Herbario: Las Mejores Alternativas Naturales a los Medicamentos*. Estados Unidos: Rodale Books
- Yáñez, X., Lugo, L., y Parada, D. (2007). Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad Valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander, Colombia). Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Biología Química. *Revista BISTUA*, 5(1), 3-8. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90350101>
- Zambrana, T. (2005). Beneficios de la fitoterapia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 10(2), 01-02. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v10n2/pla01205.pdf>
- Zoluaga, FO., Morrone, O. y Rodríguez, D. (1999). Análisis de la biodiversidad en plantas vasculares de la Argentina. *Kurtziana*, 27(1), 17-167. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/280021545_Analisis_de_la_biodiversidad_en_plantas_vasculares_de_la_Argentina