



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Composición química del aceite esencial de *Citrus
paradisi* “Toronja”, actividad antioxidante y
determinación de la actividad antibacteriana frente a
*Streptococcus mutans***

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Recursos
Vegetales y Terapéuticos

AUTOR

Guillermo Fernando VILLA GONZALES

ASESOR

Américo Jorge CASTRO LUNA

Lima, Perú

2017



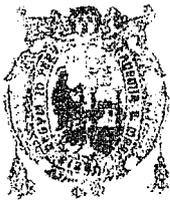
Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Villa G. Composición química del aceite esencial de *Citrus paradisi* “Toronja”, actividad antioxidante y determinación de la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* [Tesis de maestría]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica / Unidad de Posgrado; 2017.



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN RECURSOS VEGETALES Y TERAPÉUTICOS**

Siendo las 13:30 hrs. del 23 de junio de 2017 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. Yadira Fernández Jeri e integrado por los siguientes miembros: Dr. Américo Jorge Castro Luna (Asesor), Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz, Mg. Amelia Elizabeth Carranza Alva y el Mg. Edgar Robert Tapia Manrique; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: "**Composición química del aceite esencial de *Citrus paradisi* "Toronja", actividad antioxidante y determinación de la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans***", presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica **GUILLERMO FERNANDO VILLA GONZALES**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

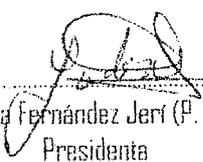
A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

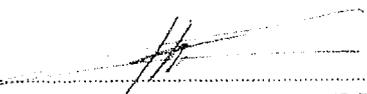
Bueno (16)

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica **GUILLERMO FERNANDO VILLA GONZALES**, el Grado Académico de **Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos**.

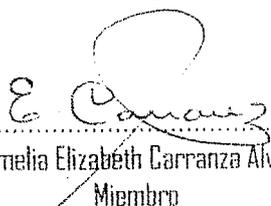
Siendo las 14:50 hrs. se levanta la sesión.

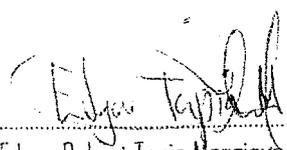
Se extiende el acta en Lima, a las 14:55 hrs. del 23 de junio de 2017.


Dra. Yadira Fernández Jeri (P. Asoc. T.C.)
Presidenta


Dr. Américo Jorge Castro Luna (P.P., D.E.)
Miembro - Asesor


Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz (P. Asoc. T.C.)
Miembro


Mg. Amelia Elizabeth Carranza Alva (P. Asoc. D.E.)
Miembro


Mg. Edgar Robert Tapia Manrique (P. Aux., T.C.)
Miembro

Observaciones:

Dedicatoria

A Dios por darme salud y vida por permitirme realizar este aporte a la ciencia

Mis padres, en especial a mi madre por su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida, a mi padre por darme la fortaleza para seguir en mi vida profesional.

A mi esposa Juanita por darme la tranquilidad necesaria en mi vida y a mis hijos Fernando y Jimena siempre los tengo presente y son la fuente de mi inspiración.

A mis hermanos Ricardo, Carla y Cristina por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi Asesor, Dr. Américo Castro Luna, por brindarme sus conocimientos de manera incondicional y ser el soporte ideal en la realización de la presente tesis.

A los miembros del jurado por sus valiosos aportes que han hecho posible la conclusión de la presente tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	Pág.
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	
1.1. Situación problemática	2
1.2. Formulación del problema	2
1.3. Justificación teórica	3
1.4. Justificación práctica	3
1.5 Objetivos.....	4
1.5.1 Objetivo General.....	4
1.5.2 Objetivos específicos.....	4
CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO	
2.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación	5
2.2. Antecedentes de la investigación	5
2.3. Bases Teóricas	8
CAPITULO 3: METODOLOGÍA.....	16
CAPITULO 4: RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	45
RECOMENDACIONES	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS.....	57

TABLAS

Tabla 1: Análisis preliminar y ensayos fisicoquímicos de <i>Citrus paradisi</i> Macfad “Toronja”	24
Tabla 2: Composición química cualitativa del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> Macfad “Toronja”, determinado por Cromatografía de Gases / Espectrofotometría de Masas (CG/EM)	26
Tabla 3: Resultados de la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> Macfad frente a DPPH	39
Tabla 4: Formación de halos de inhibición de <i>Streptococcus mutans</i> en agar Mueller Hinton frente al aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> Macfad “Toronja”, empleando el método de difusión en agar.	41

FIGURAS

Figura 1: Flujograma de trabajo experimental	18
Figura 2: Reacción de la donación de electrones del radical DPPH	20
Figura 3: Cromatograma del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> Macfad "Toronja" obtenido por hidrodestilación, empleando la técnica de Cromatografía de Gases / Espectrofotometría de Masas (CG/EM) en el espectro de 12,54 a 36,21.	25
Figura 4: Espectro de la estructura de alfa-pineno	27
Figura 5: Espectro de la estructura de beta-pineno	27
Figura 6: Espectro de la estructura de beta-mirceno	28
Figura 7: Espectro de la estructura de D-limoneno	28
Figura 8: Espectro de la estructura de 1,3,6-octatreno, 3,7-dimetil-,(z)	29
Figura 10 : Espectro de la estructura de 1,4-ciclohexadieno, 1-metil-4-(1-Metiletil)- Gamma Terpineno	29
Figura 11: Espectro de la estructura de 1-octanol	29
Figura 12: Espectro de la estructura de cis-linaloloxido	30
Figura 13: Espectro de la estructura de Isoterpinolona	30
Figura 14: Espectro de la estructura de terpineol,cis-beta-	31
Figura 15: Espectro de la estructura de nonanal	31
Figura 16: Espectro de la estructura de 4-methyl-1,5-heptadiene	31
Figura 17: Espectro de la estructura de 2-cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-,trans-	32
Figura 18: Espectro de la estructura de 6-octenal, 3,7-dimethyl-,(R)-	32
Figura 19: Espectro de la estructura del ácido octanoico	32
Figura 20: Espectro de la estructura de cyclopropane, 1-butyl-2-(2-methylpropyl)-	33
Figura 21: Espectro de la estructura de 1-nonyne, 7-methyl	33
Figura 22: Espectro de la estructura de p-menth-1-en-8-ol	33
Figura 23: Espectro de la estructura de decanal	33
Figura 24: Espectro de la estructura de farnesol isómero A	34
Figura 25: Espectro de la estructura de 2,6-octadienal, 3,7-dimethyl-(z)- /Beta citral	34
Figura 26: Espectro de la estructura de 2,6-octadienal, 3,7-dimethyl-,(E) / alfa citral	34
Figura 27: Espectro de la estructura de 1-cyclohexene-1-carboxaldehyde,4-(1-methylethenyl)- /Peryllaaldehido	35
Figura 28: Espectro de la estructura de 3-methyl-4-isopropylphenol / p-timol	35
Figura 29: Espectro de la estructura de p-mentha-1(7), 8(10)-dien-9-ol	35
Figura 30: Espectro de la estructura de 2z,6e-farnesol	36
Figura 31: Espectro de la estructura de isoeugenol 2	36
Figura 32: Espectro de la estructura de decanoic acid	36
Figura 33: Espectro de la estructura de 3-dodecyne	37
Figura 34: Espectro de la estructura de acetato de nerilo	37
Figura 35: Espectro de la estructura de copaeno	37
Figura 36: Espectro de la estructura de alpha-cubebene	38
Figura 37: Espectro de la estructura de undecanal	38
Figura 38: Espectro de la estructura de trans (beta)-cariofileno	38
Figura 39: % de inhibición del radical dpph frente al aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> Macfad	40

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la composición química del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad. “toronja”, actividad antioxidante y antibacteriana *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*. El aceite esencial se obtuvo tratando aproximadamente 25 kg de cáscara de frutos en un sistema de hidrodestilación por arrastre de vapor de agua a temperatura y presión controlada, obteniéndose un rendimiento de 0,13 mL% v/p, realizándose asimismo el análisis preliminar del aceite esencial y sus propiedades fisicoquímicas: gravedad específica (0,852 g/mL), Índice de Refracción (1,351) y pH (5,9). Del análisis cualitativo de la composición química realizado en Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas (CG/EM), se destacan los siguientes componentes químicos: dieciséis monoterpenos, cinco sesquiterpenos, dos ácidos orgánicos, cuatro aldehídos, un éster, cinco hidrocarburos, un fenilpropanoide. La evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial se realizó utilizando el métodos: Captación del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH), los resultados indican que el aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad no posee actividad antioxidante frente al patrón estándar de Trolox ®. La determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial, se realizó utilizando el método de difusión en agar mostrando actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668 en 100, 50 y 25 por ciento, utilizando el antibacteriano ciprofloxacino como control positivo.

Palabras clave: Aceite esencial, *Citrus paradisi* Macfad, actividad antioxidante, actividad antibacteriana, *Streptococcus mutans*.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the chemical composition of essential oil of *Citrus paradise* Macfad "toronja", antioxidant and antibacterial activity *in vitro* against *Streptococcus mutans*. The essential oil was obtained from 25 kg of fresh fruits in a system with hydrodistillation drag of water vapor temperature and controlled pressure, getting a yield of 0,13 mL % v/p, also performed the preliminary analysis of the essential oils and their physicochemical properties: specific gravity (0,852g / mL), refractive index (1,351) and pH (5,9). Qualitative analysis of the chemical composition performed by gas chromatography / mass spectrometry (GC / MS), identifying the elucidation of the following chemicals: Sixteen monoterpenes, five sesquiterpenes, two organic acids, four aldehydes, one ester, five hydrocarbons, one phenylpropanoid. The evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of essential oil was conducted using the method of capturing 2,2-difenilpicrilhidrazil radical (DPPH) the results indicate that the essential oil of *Citrus paradisi* Macfad no presents antioxidant activity against the standard of Trolox. The determination of antibacterial activity *in vitro* of the essential oil was performed using the agar diffusion method, showing antibacterian activity against *Streptococcus mutans* strain clinical at concentrations of 100, 50 and 25 percent, using ciprofloxacin as a positive control.

Keywords: Essential oil, *Citrus paradise* Macfad, antioxidant activity, antibacterial activity, *Streptococcus mutans*.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

El uso indiscriminado y empírico de antibacterianos, conlleva a la resistencia bacteriana, siendo *Streptococcus mutans* una bacteria Gram positiva que presenta resistencia a muchos tipos de antibióticos como las penicilinas, los macrólidos y cefalosporinas, originando una incesante búsqueda de nuevas moléculas con actividad antibacteriana en fuentes naturales como los aceites esenciales de las plantas (Coy y Acosta, 2013).

Los antioxidantes son moléculas con propiedades anti radical libre porque neutralizan el daño a nuestro organismo de especies reactivas de oxígeno como peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radical hidroxilo entre otros. Para aumentar el tiempo de conservación de los alimentos la industria de los alimentos utiliza antioxidantes sintéticos relacionados con la aparición de cáncer (Nobuyoki et al., 2003). Sasse et al. (2009) realizó un estudio comparativo en alimentos perecibles donde concluye que los antioxidantes de origen natural poseen una mayor actividad antioxidante comparada con los antioxidantes de origen sintético.

Este estudio tiene como objetivo caracterizar la composición química del aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi* Macfad “toronja” y determinar si posee propiedad antioxidante y antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*.

1.2. Formulación del problema

Problema General

¿Los componentes químicos del aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi* Macfad “toronja” poseen actividad antioxidante, actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*?

Problemas específicos

¿Cuáles son los componentes químicos del aceite esencial obtenido de la cáscara de *Citrus paradisi* Macfad “Toronja”?

¿Los componentes químicos que se encuentran en el aceite esencial obtenido de la cáscara de *Citrus paradisi* Macfad “Toronja” poseen actividad antioxidante *in vitro*?

¿Los componentes químicos que se encuentran en el aceite esencial obtenido de la cáscara de *Citrus paradisi* Macfad “Toronja” poseen actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans in vitro*?

1.3. Justificación teórica

- ✓ Búsqueda de aceites esenciales con actividad antibacteriana frente a la bacteria Gram positiva *Streptococcus mutans*.
- ✓ Búsqueda de aceites esenciales con actividad antioxidante para reemplazar los antioxidantes sintéticos como Butilhidroxitolueno (BHT), Butilhidroxianisol (BHA), Terbutil hidroquinona (TBHQ), y Etoxiquina (EQ) utilizados en la industria alimentaria como conservantes para prolongar el tiempo de almacenamiento, pero con efectos tóxicos en los seres humanos como inductores de cáncer hepático, hepatomegalia, hipersensibilidad entre otros.

1.4. Justificación práctica

- ✓ Contribuir al conocimiento de los componentes químicos del aceite esencial de la cáscara *Citrus paradisi* Macfad procedente de la ciudad de Huaral, y comparar con los que menciona en las referencias bibliográficas.
- ✓ Contribuir al conocimiento de las propiedades antibacterianas del aceite esencial obtenido de la cáscara de *Citrus paradisi* Macfad. Los aceites esenciales obtenidos del género *Citrus* poseen actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, pero no se encuentran estudios de la especie propuesta en la presente tesis frente a

Streptococcus mutans relacionada a la caries y gingivitis, este conocimiento nos llevaría a proponer, en futuros estudios, formas farmacéuticas como colutorios para tratar afecciones bucales.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

Determinar la composición química del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad, “toronja”, actividad antioxidante y antibacteriana *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Determinar la composición química del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad “toronja” por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas. (CG/EM).
2. Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad “toronja” utilizando el método del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH).
3. Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad “toronja” frente a *Streptococcus mutans* utilizando el método de difusión en agar.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Marco filosófico o epistemológico de la investigación

La investigación es un proceso sistemático, crítico y empírico para estudiar un fenómeno o problema, por lo tanto, esa capacidad de investigar es un instrumento que nos permite crear y facilitar el bienestar integral del ser humano.

Dos mitos se han construidos alrededor de la investigación científica: una que considera que la investigación es complicada y difícil, y otra que no está vinculada al mundo cotidiano y a la realidad (Sampieri, 2014). Sin embargo, a través de la investigación se ha perfeccionado procesos metodológicos, creando nuevas soluciones que han servido al desarrollo desde las primeras civilizaciones hasta la actualidad.

Los diferentes tipos de interrogantes e hipótesis demanda diferentes tipos de diseños metodológicos y en una investigación, estos realmente se clasifican en cuantitativos y cualitativos (Sousa, 2007). El diseño de la investigación cuantitativa representa una guía correctamente estructurada y exacta de cómo se va a realizar la investigación; los planteamientos que se van a investigar son específicos y delimitados desde el inicio del estudio; por consiguiente debe ser objetiva y seguir un patrón predecible y estructurado, teniendo como meta principal formular y demostrar las teorías.

Las principales áreas del ejercicio profesional del farmacéutico en los países de América y de mayor crecimiento en las últimas décadas son: alimentos, toxicología y química que está relacionada al desarrollo de la presente tesis, intervenir en la investigación para extraer, investigar, identificar y conservar principios activos, medicamentos y nutrientes naturales u obtenidos de procesos sintéticos y/o biotecnológicos son acciones propias del hacer farmacéutico (OPS, 2014).

El presente trabajo de investigación se sustenta en las bases epistemológicas con enfoque hipotético deductivo en la línea de

investigación que busca nuevas sustancias naturales con actividad antibacteriana y antioxidante.

2.2 Antecedentes de investigación

Antioxidantes naturales versus sintéticos

Entre los antioxidantes sintéticos más usados en la industria alimentaria que estabilizan y protegen grasas vegetales y animales tenemos al Butilhidroxitolueno (BHT), Butilhidroxianisol (BHA), Terbutil hidroquinona (TBHQ), (International Life Sciences Institute, 1996; Mingzhen & Jiankai, 2012) también Etoxiquina (EQ), (De Koning, 2002) utilizada como conservante en alimentos para animales y humanos. Sin embargo, se han encontrado efectos dañinos en humanos, como el aumento del colesterol, hepatomegalia e inducción de cáncer hepático, hipersensibilidad entre otras (Pellegrini *et al.*, 1999; Vargas y Bottia, 2008; Rodríguez-Trabado *et al.*, 2007), en razón a ello se prefiere utilizar antioxidantes naturales que son encontrados en las plantas como el licopeno, β -caroteno y compuestos polifenólicos; entre los que destacan los flavonoides, antraquinonas, cromonas, cumarinas constituyendo importantes grupos de antioxidantes naturales (Avello y Suwalsky, 2006).

Aceites esenciales con propiedades antioxidantes y antimicrobianas

Un estudio sobre la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L. (orégano), *Rosmarinus officinalis* L. (romero) y *Coriandrum sativum* L. (cilantro), en emulsiones de agua en aceite (Ag/Ac) y aceite en agua (Ac/Ag), sometidas al deterioro oxidativo por medio de la radiación ultravioleta, se demostró que en la emulsión de Ag/Ac, el aceite esencial de orégano presentó actividad antioxidantes superior a la del cilantro y el romero, e incluso a la de la vitamina E y así mismo; el aceite esencial de orégano presentó una acción protectora más baja en la emulsión de Ac/Ag (Tafur *et al.*, 2005).

El aceite esencial obtenido de *Zingiber officinale* “jengibre” basado en su composición química de monoterpenos y sesquiterpenos, se estimó que puede ejercer una acción antimicrobiana sobre algunos microorganismos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* (Vásquez O. et al., 2001).

Al realizar el estudio de las actividades anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “urqu muña” con la aplicación de tres modelos antioxidantes, se determinó que la especie posee efecto anti *Helicobacter pylori* y que su aceite esencial muestra un significativo efecto antioxidante comparado con el trolox como muestra control, atribuyendo la actividad antioxidante a los siguientes constituyentes de su composición química: pulegona, linalol, mentona, β -pineno, β -myrceno limoneno, p-cimeno, y α -terpineol (Carhuapoma, 2007).

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) demostró actividad antimicótica *in vitro* frente a las cepas de *Candida albicans* a las concentraciones de 50 y 100 por ciento y frente a los dermatofitos *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton tonsurans*; encontrándose en el aceite esencial los siguientes componentes químicos: Pulegona, mentona y limoneno (Cano, 2008).

Plantas con aceites esenciales y propiedad antibacteriana frente a

Streptococcus mutans

Moromi y Martinez (2006) investigaron en *Camellia sinensis*, té verde, planta nativa del Asia, concluyeron que por su contenido polifenólico, puede ser utilizada como una alternativa en la prevención de la formación de la placa dental.

Ferrazano et al. (2009) concluyeron que los polifenoles contenidos en bebidas estimulantes de plantas como *Theobroma cacao* L, “cacao”; *Coffea arabica*, “café”; y *Camellia sinensis*, “té verde”, poseen efectos anticariogénicos por su actividad antibacteriana evitando la formación de

biopelículas y producción de ácidos por parte del *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*.

Shayegh et al. (2008) evaluaron *in vivo* en hombres y mujeres voluntarios la formación de biopelículas de bacterias, utilizando los aceites esenciales de *Mentha piperita*, *Cuminum cyminum* comparándolos con clorhexidina contra biopelículas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*, se determinó que los aceites esenciales fueron eficaces en comparación con la clorhexidina en reducir la formación de biopelículas; exponiendo un posible papel de los aceites esenciales en el desarrollo de nuevos tratamientos anticaries. En una revisión se concluyó que los polifenoles pueden ayudar a prevenir el cáncer bucal. (Petti y Crippian, 2009)

2.3. BASES TEÓRICAS

2.3.1 *Citrus paradisi* Macfad.

2.3.1.1. Origen

El origen de esta especie no se conoce con exactitud, aunque numerosas investigaciones señalan que se trata de una hibridación natural entre el naranjo dulce (*Citrus sinensis*) y el pummelo (*Citrus grandis*) ocurrido en Barbados, en las Indias Occidentales alrededor del siglo XVII. Desde allí, su cultivo se extendió por todo el Caribe, y posteriormente a los Estados Unidos, pero cobró popularidad a partir de fines del siglo XIX. Hoy en día, se cultiva en varios países tropicales y subtropicales (Amórtegui 2001; Davies y Albrigo, 1994).

2.3.1.2. Clasificación botánica

Según el sistema de clasificación de Cronquist (1988), la especie vegetal tiene la siguiente posición taxonómica:

Reino: Vegetal

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Rutáceas

Género: Citrus

Especie: ***Citrus x paradisi*** Macfad

Nombre vulgar: “toronja”

2.3.1.3. Características morfológicas

La toronja alcanza una altura normal de 4.5 a 6.0 m, pero en ocasiones hasta los 13 m, con una forma redonda de la copa, el tallo alcanza diámetros que exceden los 15 cm y se caracteriza por producir ramas con frutos en racimos. Es perennifolio con hojas en forma de óvalo de 7.5 a 15.0 cm de longitud y 4.0 a 7.5 cm de ancho (Loussert, 1992).

La flor es de color blanca con fragancia, es perfecta con 5 sépalos y pétalos de 20 a 25 estambres rodeando el gineceo con un estigma en forma de dona. El ovario está compuesto de 10 a 14 lóculos con posición superior que cuenta además, con un disco nectario que atrae a las abejas y mediante su polinización incrementa el porcentaje de fecundación. (Agustí, 2003; Amorós, 2003).

El fruto se clasifica como un hesperidio que se divide en segmentos en los cuales cada uno de estos tiene cientos de vesículas con jugo, denominado “pulpa” que comprende la mayor parte de la porción comestible. El color de la pulpa puede ser desde blanca, rosa hasta rojo intenso, existiendo dentro de estos rangos diferentes intensidades. Una característica distintiva de esta especie es la producción de fruta en racimos. Las partes que conforman un fruto de toronja son, los septos que es el divisor de lo que comúnmente llamamos gajos (Agustí *et al*, 2003); la corteza, exocortis o flavedo que puede ser desde verde, blanca, amarilla, rosa, naranja y roja con vesículas que contienen aceites esenciales; el mesocarpio o albedo que es la porción corchosa de color blanco; los gajos, endocarpio o vesículas de jugo que es la porción comestible; semillas y eje central. La alimentación del gajo o vesícula normalmente se cree que es del eje central, sin embargo, su alimentación es de los septos. Se puede observar que de los septos sale un cordón umbilical a

cada vesícula para su alimentación (Agustí *et al*, 2003; Martínez *et al.*, 2010; Soler y Soles, 2006).

2.3.1.4. Variedades

Existe una gran diversidad de variedades las cuales se clasifican en dos grupos de acuerdo al color de la pulpa. En el primer grupo se incluyen las variedades blancas o comunes, siendo la variedad Marsh la más importante. En el segundo grupo engloba las variedades pigmentadas, con un color de pulpa que va desde el rojo hasta el rosa como son la Rio Red, Star Ruby y la Ruby, entre otras, que están adquiriendo mayor popularidad entre los consumidores. La variedad Rio Red, conocida como doble roja, ha tenido una gran aceptación en el mercado nacional e internacional para consumo en fresco (Padrón-Chávez y Rocha-Peña, 2007).

2.3.1.5. Distribución Geográfica

En el Perú, la toronja crece en las regiones de Lima e Ica y están disponibles para la exportación en los meses de junio, julio y agosto (PromPerú, 2009).

Los principales países productores de toronja en el 2014, fueron China, Estados Unidos, México, Sudáfrica, Tailandia. Según la FAO en el año 2014 se produjeron cerca de 7625.4 millones de toneladas de toronja, siendo Estados Unidos el principal productor líder con más de 230 millones de toneladas (FAO 2015).

Se considera que la latitud óptima para el cultivo del toronjo es entre 24° y 40° es decir entre subtropical y semiárido, donde las temperaturas máximas son de hasta 45°C y las mínimas son mayores a -6.6°C. El clima tiene efectos relevantes en la producción de toronja ya que por ejemplo en regiones mediterráneas (climas subtropicales o semiáridos), las bajas temperaturas por la noche, noches largas y baja humedad relativa provoca una floración concentrada en la primavera, producen frutos con corteza más gruesa, sin manchas, brillante y buena relación de sólidos solubles-acidez que cumplen con calidad para exportación. En cambio en los trópicos es todo lo contrario, es decir floración distribuida en todo el año con calidad de fruto principalmente para jugo, debido a que no cumple con la calidad para mercado fresco

internacional, su consumo en fresco es normalmente nacional, jugo nacional e internacional (Morton, 2003; Palacios, 2005).

2.3.1.6. Usos

El toronja también conocido como pomelo es considerado el cuarto cítrico en importancia, después de la naranja, limón y mandarina. Los frutos en fresco se consumen en las comidas de entrada o de postre y procesados en mermeladas o en jugos, tanto naturales como concentrados. La industria aprovecha una parte de la producción principalmente para la elaboración de jugos, envasado de gajos y pequeñas cantidades para mermeladas (Gaitán, 2002).

2.3.2 Aceites esenciales

El valor medicinal de las plantas con propiedades terapéuticas, se debe a la presencia de sustancias químicas o principios activos que produce un efecto fisiológico. Mucho de los principios activos son sumamente complejos, desconociéndose aún su naturaleza química; otros han sido purificados, sintetizados o imitados. Por lo general pertenecen a una de estas categorías: aceites esenciales, alcaloides, glúcidos, taninos, sapogeninas, fenoles, quinonas, terpenos, carotenoides, cumarinas, flavonoides, resinas (Thompson, 1981).

2.3.2.1 Propiedades físicas de los aceites esenciales

Agapito y Sung (2003), indica que los aceites esenciales pueden presentar las siguientes propiedades físicas:

- Líquidos a temperatura ambiente (a diferencia de los aceites “fijos”).
- Muy raramente son coloreados.
- En general, su densidad es inferior a la del agua.
- Poseen un índice de refracción elevado.
- Desvían la luz polarizada.
- Son liposolubles y solubles en los disolventes orgánicos habituales.
- Se pueden extraer por arrastre en vapor de agua (muy poco solubles en ella).
- Punto de ebullición es superior a los 100 °C.

2.3.2.2 Composición química de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de componentes muy volátiles, como terpenos y compuestos oxigenados, los cuales pueden ser obtenidos de diferente material vegetal (flores, ramas, semillas, hojas, cortezas, hierbas, madera, frutos y raíces) bien sea por prensado o por hidrodestilación (Burt, 2004), son generalmente líquidos y rara vez sólidos (Duraffourd et al, 1983; Font Quer, 1982; Lock, 1988).

Los aceites esenciales son químicamente una mezcla compleja y muy variables de hidrocarburos alicíclicos, también denominados terpenos como ejemplo en los hidrocarburos terpénicos figuran los limonenos, el mirceno, el pineno. Entre los alcoholes terpénicos más importantes, el geraniol, citronelo, etc. Los terpenos por su composición, pueden derivar de la condensación de dos moléculas de Isopreno. En los mismos aceites esenciales, y en otros productos naturales, aparecen compuestos derivados, análogamente, del isopreno, de modo que la calificación de terpeno se extiende a todos aquellos, dividiéndolos en hemiterpenos C_5H_8 , terpenos propiamente dichos, sesquiterpenos $C_{15}H_{24}$, diterpenos $C_{20}H_{32}$ y politerpenos $(C_5H_8)_n$, siendo n un número elevado.(Font Quer, 1982;Lock, 1988).

Los aceites esenciales del Género *Citrus* contienen del 85 al 99% componentes volátiles y del 1 al 15% componentes no volátiles. Las sustancias volátiles son una mezcla de monoterpenos (limoneno), sesquiterpenos, hidrocarburos y sus derivados oxigenados incluyendo: aldehídos (cital), cetonas, ácidos, alcoholes (linalol) y ésteres. Los monoterpenos representan el 97% de la composición del aceite de cítricos junto con los alcoholes, aldehídos y ésteres, siendo el rango de porcentajes encontrados en los componentes de los aceites esenciales, entre el 1,8 hasta 2,2%. El componente químico principal de los aceites de cítricos es limoneno, que se encuentra desde 32 hasta 98%; en naranja dulce contiene entre 68 y 98%, limón entre 45 y 76% y bergamota con 32 y 45%. El Linalool tiene concentraciones de 0,018, 0,015 y 10,231% (v/v) en la naranja dulce, limón y bergamota, respectivamente. Los constituyentes de los aceites esenciales son importantes para determinar la calidad y la composición

cuantitativa de los aceites, que a su vez podría tener un efecto sobre el potencial antimicrobiano (Burt, 2004; Dugo y Di Giacomo, 2002).

2.3.2.3 Localización de los aceites esenciales en las plantas

Según Miller (1967), 2000 especies de plantas producen aceites esenciales. Las especies que proporcionan mayor cantidad de aceites esenciales pertenecen a las Familias Labiadas, Umbelíferas Compuestas, Mirtáceas, Laureáceas, Rutáceas y Pináceas. Los aceites esenciales se hallan en regiones circunscritas de la planta como son: raíz, tallos hojas; son segregados por estructuras especializadas como los pelos glandulares, cavidades esquizógenas.

2.3.3. Radicales libres

El radical libre (RL) es una entidad química de átomo o molécula que presenta un electrón desapareado en el orbital externo y puede tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Una molécula se convierte en radical libre al perder o ganar un electrón (Rodríguez et al., 2001).

Los radicales libres son átomos por lo general de oxígeno, altamente reactivos e inestables; que se liberan cuando el alimento es metabolizado en nuestras células para producir energía y son inactivos por mecanismos enzimáticos y otros de atrapamiento (Fleschin et al., 2000). A estos radicales libres que derivan del oxígeno se les denomina más propiamente “especies reactivas de oxígeno” (ERO), para diferenciarlos de las “especies reactivas de nitrógeno” (ERN), que comprende al óxido nítrico y al dióxido nítrico (Depeng y Cederbaum, 2003; Fehér et al., 2001).

Las alteraciones funcionales, mediadas por ERO, son una consecuencia directa de sus interacciones con macromoléculas esenciales. Pueden reaccionar indiscriminadamente con moléculas como proteínas, lípidos y ADN convirtiéndolas en moléculas “blanco” y generando un gran número de lesiones oxidativas (Weyemi et al., 2012).

2.3.4. Antioxidantes

Son sustancias capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, sin perder su estabilidad electroquímica. Actúan donando electrones y evitando que los radicales libres los capten de las células. Los antioxidantes utilizados en alimentos, previenen o inhiben el desarrollo de la rancidez o la aparición de otros compuestos de deterioro debido a la oxidación. (Huang 2005; Pokony et al., 2001; Shahidi et al., 1992).

De acuerdo a su modo de acción los antioxidantes se clasifican como bloqueadores de radicales libres, quelantes de iones metálicos y como eliminadores de oxígeno (International Life Sciences Institute, 1996; Grinsted M. 1994). Los antioxidantes pueden perder su actividad a altas concentraciones y comportarse como prooxidantes al intervenir como promotores de las reacciones de iniciación (Beckel et al., 1985).

2.3.5. Cavidad bucal y placa dental

Existen diversos microorganismos que están relacionados con la patogénesis de la caries dental como estreptococos del grupo *mutans*, *lactobacillus spp* y *Actinomyces spp* de los cuales *Streptococcus mutans* es el más importante asociado a ella. La caries y la periodontitis son causadas por un desbalance en poblaciones bacterianas de biopelículas que se forman naturalmente y ayudan a mantener el estado normal de la cavidad oral (Escribano y Matesanz, 2005).

Las bacterias que forman parte de la cavidad oral pertenecen a numerosas especies que forman la placa bacteriana (biofilm o biopelícula). Una biopelícula sana puede estar conformada por más de 700 especies de bacterias; de las cuales menos del 1% son bacterias potencialmente patogénicas, además actúa como primera línea de defensa para proteger la cavidad bucal de infecciones por bacterias patogénicas, cambios en la conformación de la biopelícula favorece el crecimiento de especies patogénicas acidúricas y acidogénicas (Milicich, 2008).

El crecimiento en biopelículas proporcionan las condiciones adecuadas para mejorar el sistema de señalización entre los organismos estreptocócicos para facilitar el intercambio genético y generar factores de virulencia. Las

poblaciones formadoras de biopelículas también pueden alcanzar zonas como senos paranasales, cavidades respiratorias, áreas de la piel de ahí su importancia como patógeno oportunista fuera de la cavidad oral (Cvitkovitch et al., 2003; Nadell et al., 2008; Nazar, 2007).

La cavidad oral es un ecosistema donde cohabitan comensales pertenecientes entre 500 y 700 especies que colonizan mucosas y dientes donde forman la placa bacteriana o biofilm, entre los cuales están los miembros del género *Streptococcus* de los cuales están incluidos las siguientes especies: *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. Salivarius* y *S. milleri*. Las especies más importantes en el humano son *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* estos se han caracterizado como colonizadores secundarios del biofilm que rodean los dientes y su patogenicidad se ha demostrado en relación a la producción de caries del esmalte, debido a la capacidad que poseen de producir ácidos a partir de la sacarosa. (Linossier y Valenzuela, 2011)

2.3.6. *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans es un coco Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir amoníaco. Usualmente no producen ni hemólisis ni decoloración en agar sangre, es principalmente alfa o gamma hemolítico en agar sangre de cordero. Aunque se han reportado unas pocas cepas hemolíticas (Hung et al., 2005).

Streptococcus mutans se ha subclasificado en varios tipos con base en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *Streptococcus mutans* son c, e, f y k. El hábitat natural de *Streptococcus mutans* es la boca humana. En cavidad oral, las colonias se adhieren muy cerca de la superficie del diente e igualmente se puede recuperar en lesiones cariosas. Con base en la composición y los enlaces de los polisacáridos de la pared celular, estreptococos del grupo *mutans* se pueden clasificar en 8

serotipos: *Streptococcus mutans*(serotipos c, e, f y k), *Streptococcus sobrinus* (serotipos d y g), *Streptococcus cricetus* (serotipo a), *Streptococcus rattus*(serotipo b), *Streptococcus ferus* (serotipo c), *Streptococcus macacae* (serotipo c) y *Streptococcus downei* (serotipo h). El serotipo c de *S. mutans* es el tipo predominante en la cavidad oral humana más que las cepas e, d, f y k (Nakano et al., 2004).

En un estudio realizado en niños en edades de pre escolar y educación primaria, se determinó la prevalencia de caries dental del 56 por ciento, estableciéndose presencia y cantidad de *Streptococcus mutans* (Aguilera et al., 2004).

El flúor inhibe la acción enzimática y los flavonoides inhiben la producción de ácido láctico (Beck, 1984); el ácido láctico inhibe la síntesis de dextranos solubles e insolubles por las cepas de *Streptococcus mutans* (Koompirojn et al., 2001).

CAPITULO 3. METODOLOGÍA

3.1 Tipo de investigación

- ✓ La investigación es de tipo cuasi experimental, prospectivo.

3.2 Entidades donde se desarrolló la investigación

- ✓ Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.
- ✓ Instituto en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Simón Pérez Alva”
- ✓ Instituto de Medicina Legal del Ministerio Público, se desarrolló la determinación de los componentes químicos del aceite esencial, por Cromatografía de Gases / Espectrofotometría de Masas (CG/EM)

3.3 Diseño del trabajo experimental

3.3.1 Colecta de la especie vegetal

Los frutos frescos de *Citrus paradisi* Macfad fueron obtenidos en la ciudad de Huaral-Perú, durante el mes de junio del 2014. Se seleccionaron los frutos de toronja en su estado de madurez, no lesionados y de color amarillo, el epicarpio del fruto fue retirado manualmente con un cuchillo en tiras constituyendo esto las cáscaras. La clasificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la UNMSM. (Ver anexos 1 y 2)

3.3.2 Obtención del aceite esencial

La cáscara de los frutos frescos de *Citrus paradisi* Macfad fueron sometidos a destilación por arrastre de vapor de agua, recibiendo el aceite en una probeta florentino (ver anexo 3). La deshidratación del aceite esencial se realizó utilizando sulfato de sodio anhidro grado reactivo, con posterior filtración y conservación del aceite en un frasco de vidrio de color ámbar a temperatura de 4°C (Cerpa, 2007).

3.3.3 Diseño del trabajo

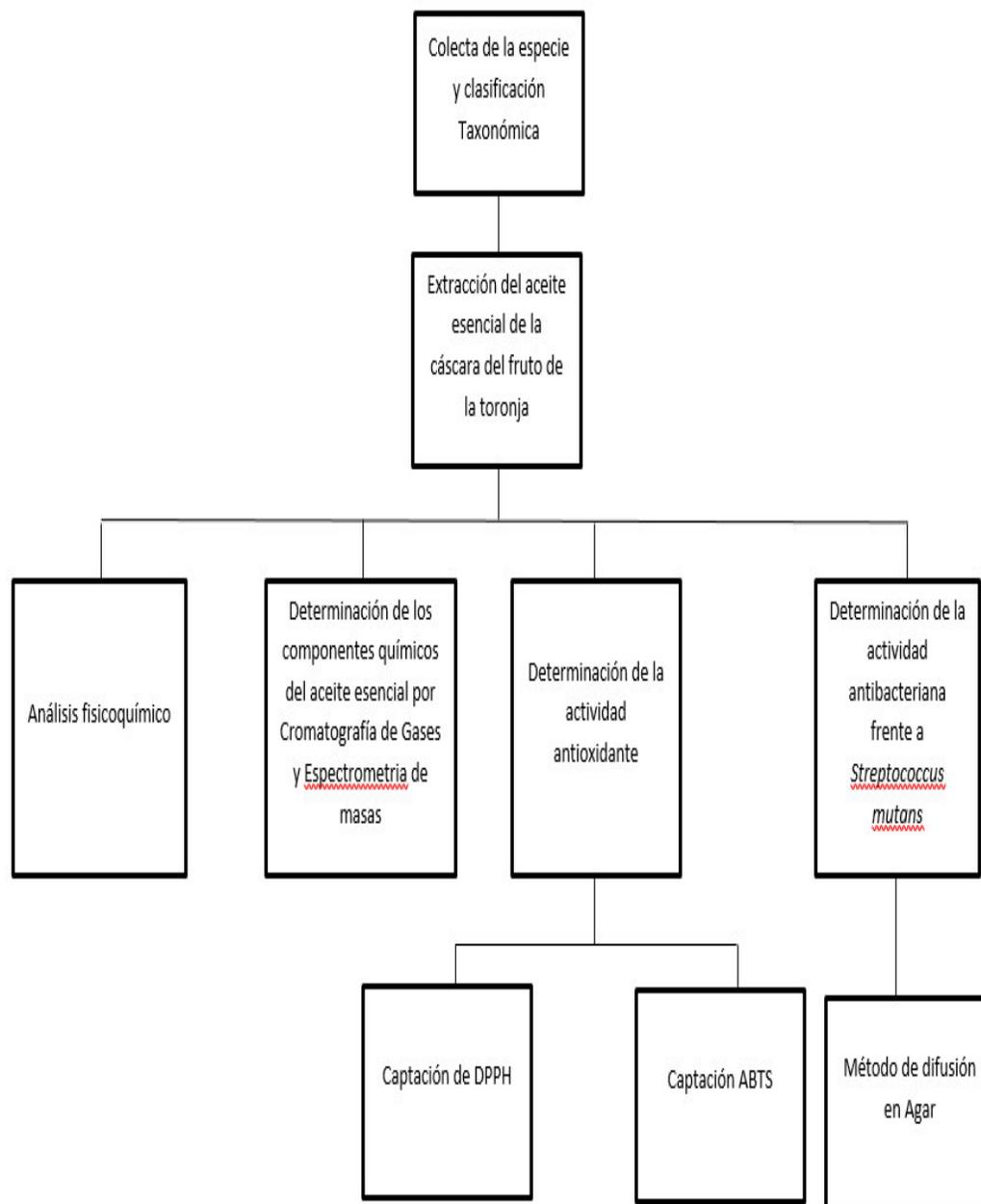


Figura 1: FLUJOGRAMA DE TRABAJO EXPERIMENTAL

3.3.4 Rendimiento del aceite esencial

El volumen de aceite esencial obtenido en la probeta florentino fue 33 mL, utilizando el método gravimétrico-volumétrico se determinó el porcentaje de rendimiento (Granados et al., 2012).

El porcentaje de rendimiento se obtiene con la siguiente expresión:

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

Donde:

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

P muestra: Peso de la muestra a destilar en gramos.

3.3.5 Análisis preliminar y fisicoquímico

Para el análisis preliminar se realizó la solubilidad del aceite utilizando soluciones orgánicas de acuerdo a su polaridad creciente asimismo se determinó el pH y el índice de refracción (AOAC, 2000).

3.3.6 Determinación de los componentes químicos del aceite esencial, por Cromatografía de Gases / Espectrofotometría de Masas (CG/EM)

Se realizó en un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas (CG/EM) Perkin Elmer, modelo GC (ver anexo 4): Clarus 600 T, MS: Turbo Massen las siguientes condiciones: Columna capilar de silica gel fundida 30 m de largo, diámetro 0,25 μm , temperatura inicial 60°C, con un tiempo de espera de 60 minutos para llegar a una temperatura final de 230° C, la temperatura de inyección: 250 °C, volumen de inyección: 1 μL . La detección y elucidación de los componentes químicos fue por comparación con los estándares de espectros de masas de las

respectivas bibliotecas. Esta técnica es muy común para la determinación de la composición química de aceites esenciales (Masada, 1997; Soto et al., 2013).

3.3.7 Determinación de la capacidad de capturar radical libre

3.3.7.1 Método de captación del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH)

Fundamento

El DPPH es un radical libre estable, que presenta coloración púrpura con absorbancia a 517 nm. Las sustancias atraparoras de radicales libres (donadoras de H) reaccionan con este compuesto y producen la desaparición del color (ver Figura 2). Los resultados se expresarán como IC50, porcentaje de inhibición (%), porcentaje de actividad antirradicalaria o equivalentes a trolox (Brand et al., 1995; Moon y Shibamoto, 2009).

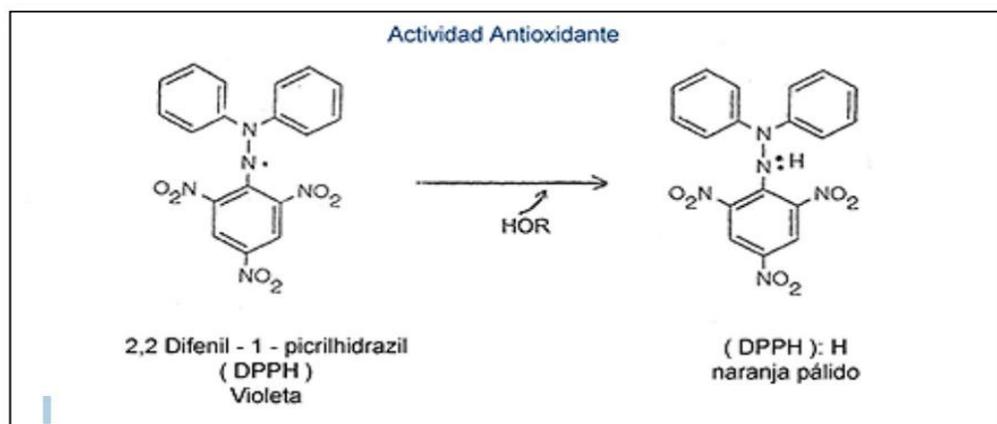


Figura 2. Estructura del DPPH antes y después de la reacción antioxidante (Alam et al., 2012)

Preparación de la muestra

- ✓ Se tomó 500 μL del aceite esencial de la cáscara de toronja y se diluyó en 5 mL de etanol. Se obtuvo una solución de concentración 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

- ✓ A partir de la solución inicial del aceite esencial de toronja se prepararon diluciones con las siguientes concentraciones: 50, 25 y 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Preparación de la solución de DPPH:

Se pesó 20 mg de DPPH y se disolvió con cuidado en 50 mL de metanol. Se obtuvo una solución stock de 40 mg/100 mL la solución se guardó en un frasco de vidrio ámbar y en refrigeración.

Se preparó una solución de trabajo de DPPH, se midió 1,7 mL de solución stock de DPPH y se llevó a volumen de 20 mL con metanol. Se midió su absorbancia a 517 nm y se obtuvo una absorbancia entre 0,600 - 0,700.

Procedimiento

- a) Se calibró el espectrofotómetro con un blanco que contenía 400 μL de etanol absoluto y 800 μL de metanol.
- b) Se colocó en un tubo de ensayo 400 μL del aceite esencial de toronja (concentraciones de 100, 50, 25 y 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y 800 μL de la solución de trabajo de DPPH.
- c) Se dejó en reposo durante 15 minutos alejado de la luz.
- d) Las absorbancias se leyeron en un espectrofotómetro de luz UV-Visible a una longitud de onda de 517 nm.

Además, se realizó un control de DPPH en donde se reemplazó el aceite esencial de toronja por su solvente (etanol absoluto). Cada ensayo se realizó por triplicado.

	TUBO BLANCO	TUBO CONTROL DPPH	TUBO A.E. TORONJA
METANOL	800 µl	-	-
SOLVENTE A.E. TORONJA (ETANOL)	400 µl	400 µl	-
A.E. TORONJA			400 µl
DPPH	-	800 µl	800 µl
Reposar por 30 minutos alejado de la luz. Leer a 517 nm			

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{Abs. DPPH} - \text{Abs. Muestra})}{\text{Abs. DPPH}} \times 100$$

3.4.8 Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad “toronja” frente a *Streptococcus mutans* por el método de difusión en agar (modificado de Rojas, et. al. 2003)

Fundamento:

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano mediante la difusión de la sustancia activa en un medio sólido la que se evidencia con la formación de halos de inhibición.

Microorganismo

Bacteria Gram positiva: *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

Muestra

Aceite esencial de la cáscara de toronja en concentraciones de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 y 3.125 %; utilizándose como diluyente alcohol etílico de 96° las concentraciones anteriormente indicadas corresponden a 85,2; 42,6; 21,3; 10,65; 5,32, 2,66 mg de aceite esencial de toronja.

Preparación de la suspensión del inóculo

El inóculo de la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 35688 fue preparado suspendiendo colonias puras aisladas en 5 mL de solución salina al 0,9 % hasta obtener en una turbidez de 1 McFarland comprobado espectrofotométricamente, esta medida equivale a una concentración de 3×10^8 UFC/mL.

Preparación de las placas

Se utilizó placas Petri estériles de 100 mm x 15 mm donde se vertió agar Mueller Hinton; previamente reconstituido, esterilizado, enfriado y mantenido a 45°C, a éste se le agrego 100 µL de la suspensión del inóculo de *Streptococcus mutans*.

Inoculación e incubación de la muestra

Una vez que el agar se solidificó se hicieron pozos con la ayuda de un sacabocado de 11 mm de diámetro externo y se procedió a colocar 100µL del aceite esencial en las concentraciones señaladas anteriormente a los pozos, luego las placas fueron incubadas por 24 horas a 37 °C.

Control negativo

Se utilizó DMSO y etanol.

Control Positivo

Se utilizó discos de susceptibilidad antimicrobiana con ciprofloxacino 5 µg.

CAPITULO 4: RESULTADOS

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Extracción del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad “Toronja”

A partir de 25 Kg de cáscara se obtuvo 33 mL de aceite esencial. Estos valores indican un rendimiento de 0,13 mL% v/p.

4.1.2 Análisis preliminar y ensayos fisicoquímicos

Tabla 1. Análisis preliminar y ensayos fisicoquímicos de *Citrus paradisi* Macfad

DETERMINACIONES	RESULTADOS
Análisis organoléptico	Líquido oleoso, aromático, volátil.
Miscibilidad	Inmiscible en agua y miscible en etanol absoluto y éter etílico.
Constantes físicas	pH: 5,9 Índice de refracción (21°C): 1,351 Gravedad específica (21°C): 0,852 g/mL

4.1.3 Determinación de la composición química del aceite esencial de

Citrus paradisi Macfad “Toronja”

El análisis cualitativo del aceite esencial realizado por Cromatografía de Gases / Espectrofotometría de Masas (CG/EM), elucidó e identificó los componentes químicos que se presentan en la figura 4 y tabla 2.

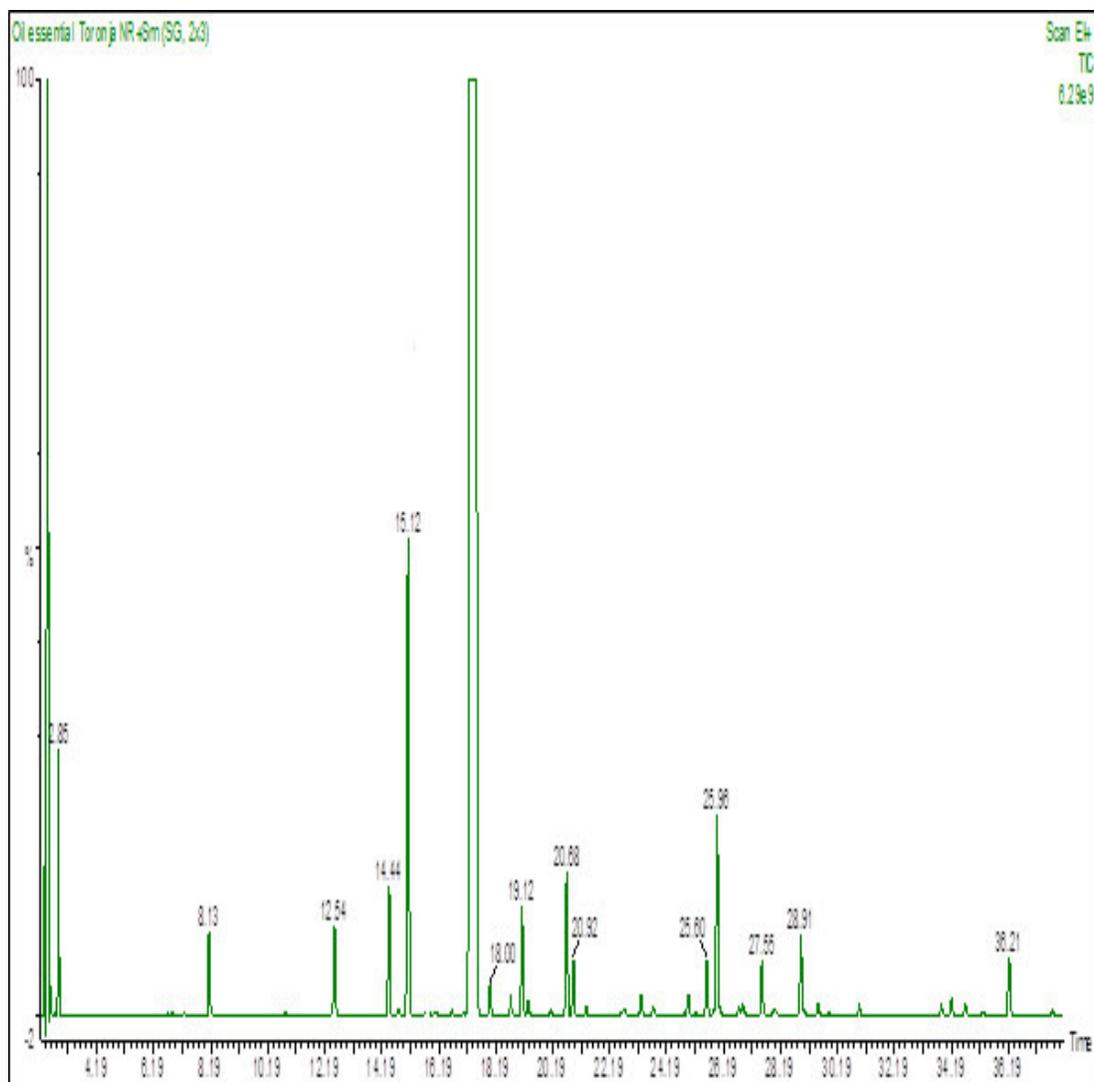


Figura 3. Cromatograma del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad “Toronja” obtenido por hidrodestilación, empleando la técnica de Cromatografía de Gases / Espectrofotometría de Masas (CG/EM) en el espectro de 12,54 a 36,21.

Tabla 2. Composición química cualitativa del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad “Toronja”, determinado por Cromatografía de Gases / Espectrofotometría de Masas (CG/EM)

COMPOSICION QUIMICA	TIEMPO DE RETENCIÓN (T.R) (minutos)
alpha-pineno	12,54
beta-pineno	14,44
Beta-mirceno	15,12
D-limoneno	17,33
1,3,6-octatrene, 3,7-dimethyl-,(z)(O cimeno)	18,00
1,4-cyclohexadiene,1-methyl-4-(1-Methylethyl)(gamma terpineno)	18,73
1-octanol	19,12
cis-linalol oxido	19,34
cyclohexeno,3-metil-6-(1-metiletilideno)- (isoterpinolona)	20,13
terpineol,cis-beta-	20,68
Nonanal	20,92
4-metil-1,5-heptadieno	21,36
2-ciclohexeno-1-ol, 1-metil-4-(1-methylethenyl)-,trans (Quercivorol)	21,94
6-octenal, 3,7-dimetil-, (R)- (isopulegol)	23,31
ácido octanoico	23,73
cyclopropano, 1-butil-2-(2-metilpropil)	24,19
1-nonino, 7-metil	24,69
p-menth-1-en-8-ol	25,60
Decanal	25,96
farnesol isómero A	26,89
2,6-octadienal, 3,7-dimetil-(z)- /Beta citral	27,55
2,6-octadienal, 3,7-dimetil-,(E) / alfa citral	28,91
1-ciclohexeno-1-carboxaldehido	29,51
3-metil-4-isopropilphenol / p-timol	29,86
p-mentha-1(7), 8(10)-dien-9-ol (alcohol)	30,11
2z,6e-farnesol (sesquiterpeno de alcohol)	32,60
isoeugenol 2 (fenilpropeno)	32,86
Ácido decanoico	32,95
3-dodecino	33,34
neril acetato	33,85
Copaeno	34,19
alpha-cubebeno	34,69
Undecanal	35,31
trans (beta)-cariofileno	36,21

Fuente: Elaboración propia

4.4 Espectros de los componente químicos del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad “Toronja”

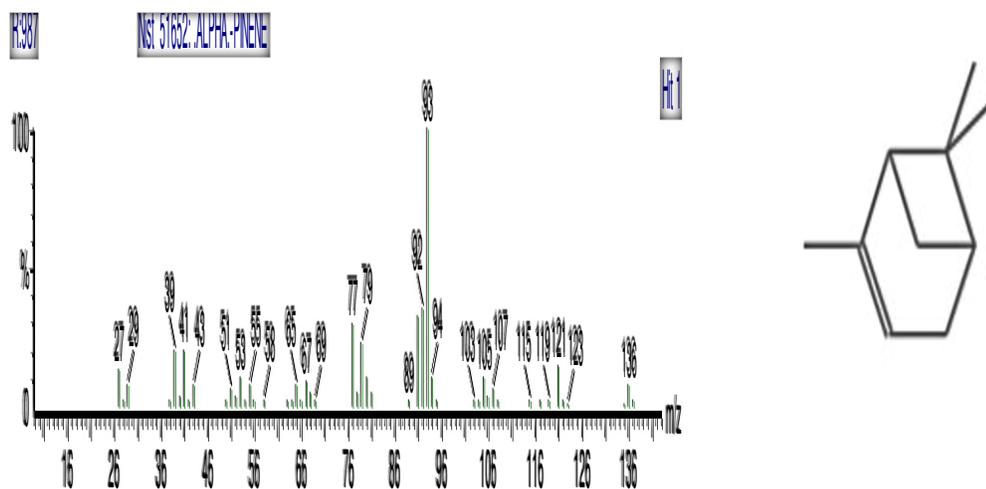


Figura 4 .Espectro de la estructura de alfa-pineno.

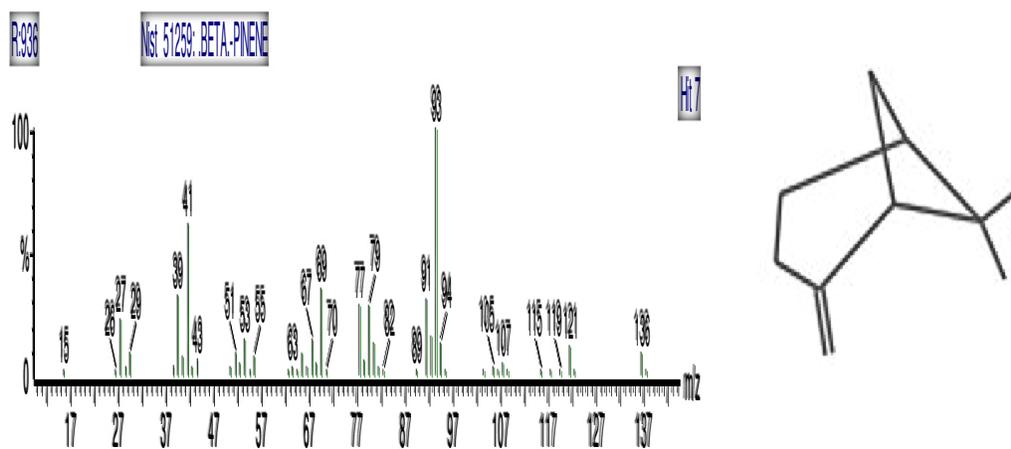


Figura 5. Espectro de la estructura de beta-pineno

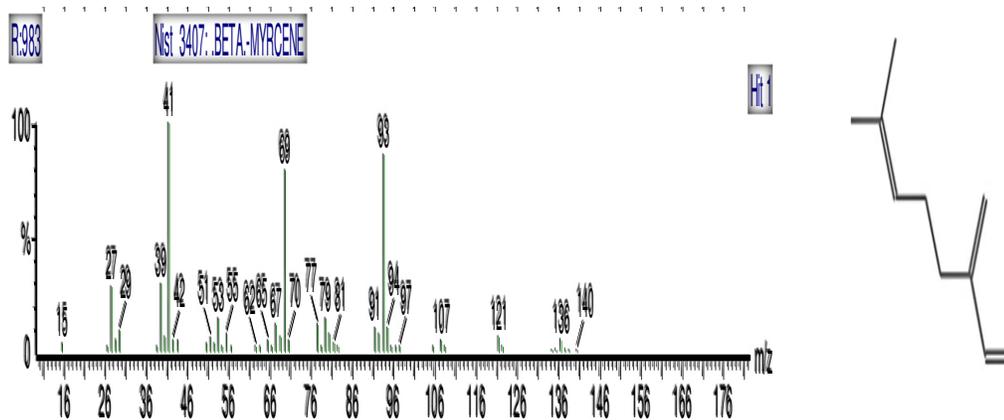


Figura 6. Espectro de la estructura de beta-myrceno

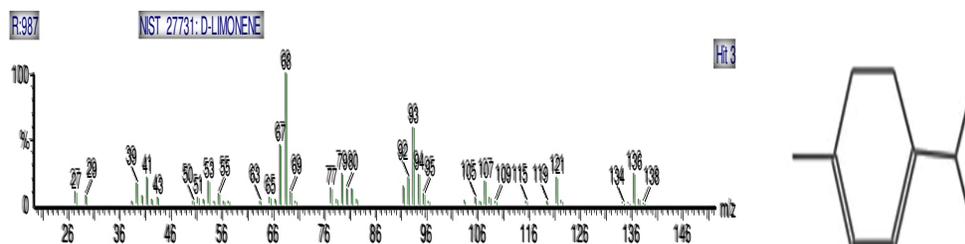


Figura 7. Espectro de la estructura de D-limonene

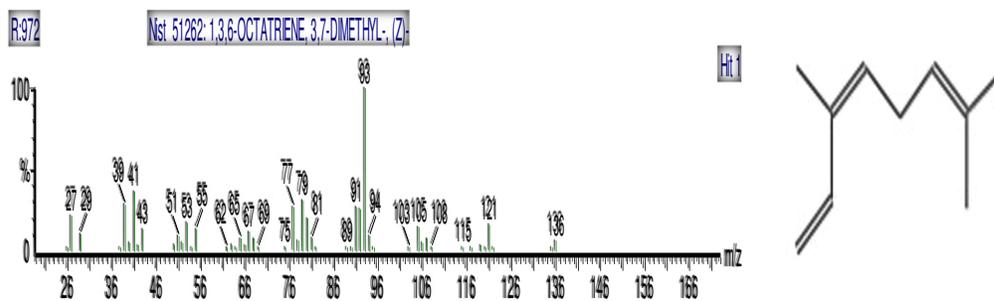


Figura 8. Espectro de la estructura de 1,3,6-octatriene, 3,7-dimethyl-, (z) /

Beta-o-cimeno

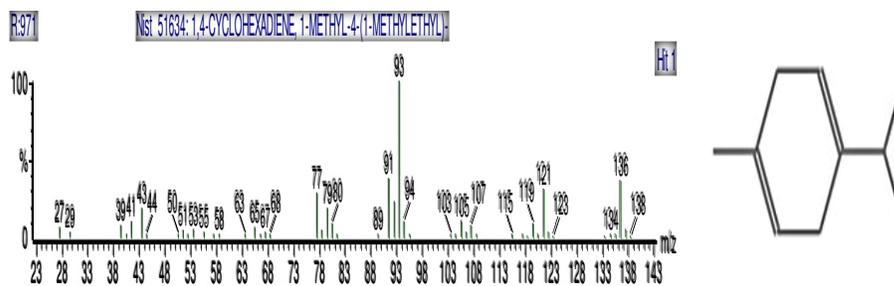


Figura 10. Espectro de la estructura de 1,4-cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-Methylethyl)-
Gamma Terpineno

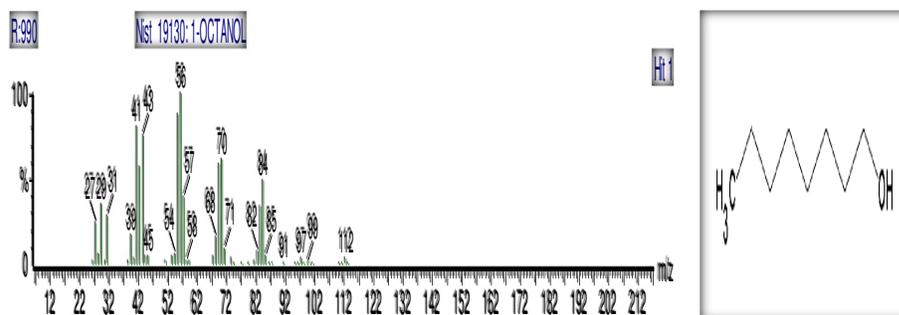


Figura 11. Espectro de la estructura de 1-octanol

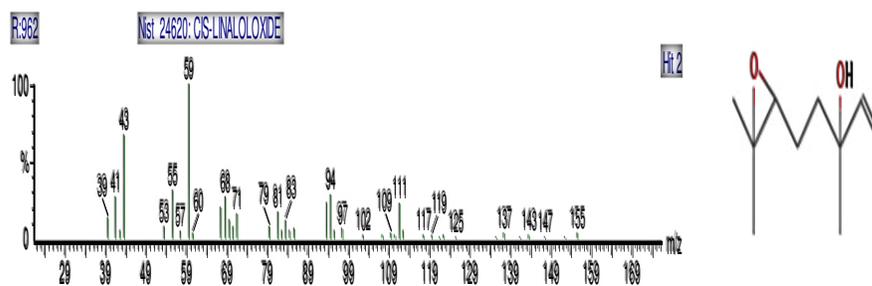


Figura 12. Espectro de la estructura de cis-linaloxide

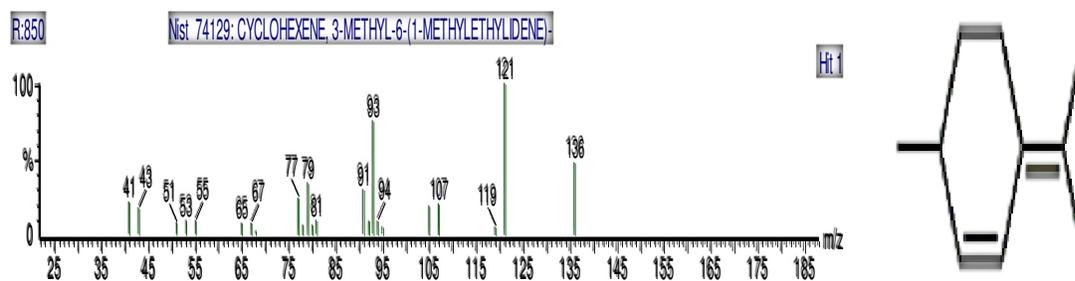


Figura 13. Espectro de la estructura de Isoterpinolona

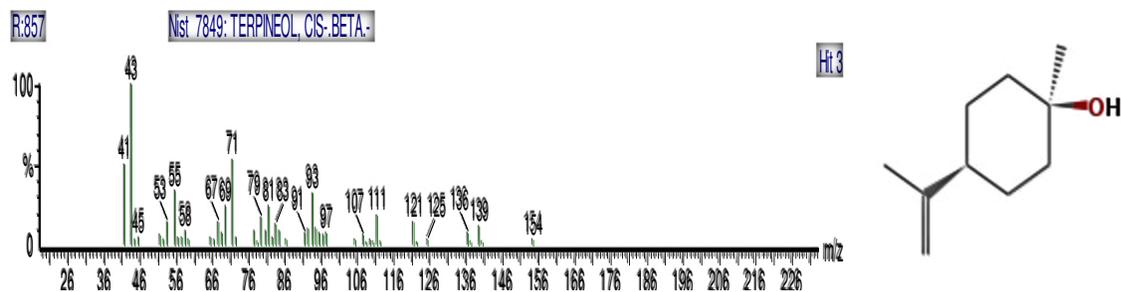


Figura 14. Espectro de la estructura de terpineol, cis-beta-

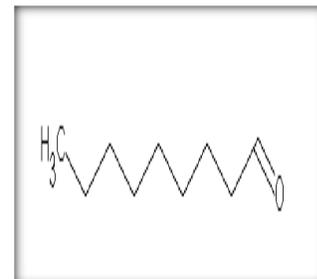
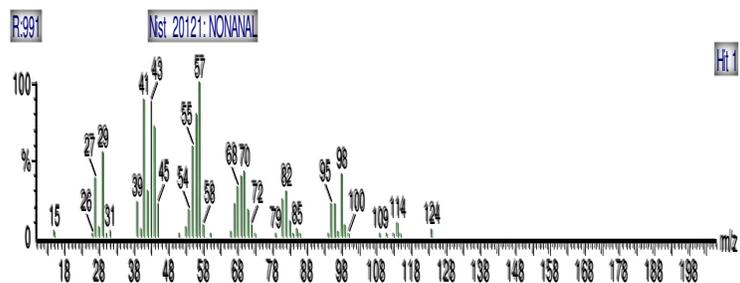


Figura 15. Espectro de la estructura de nonanal

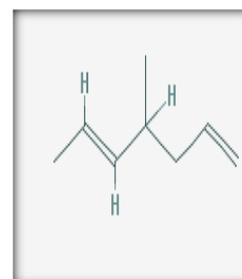
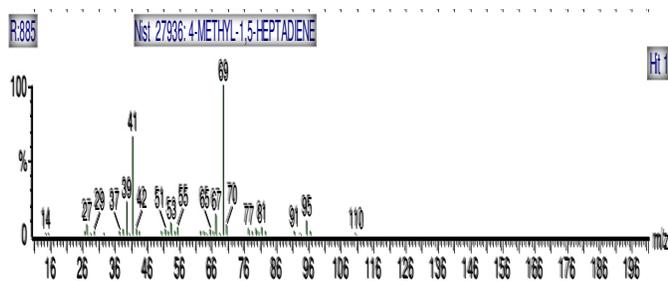


Figura 16. Espectro de la estructura de 4-methyl-1,5-heptadiene

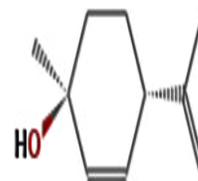
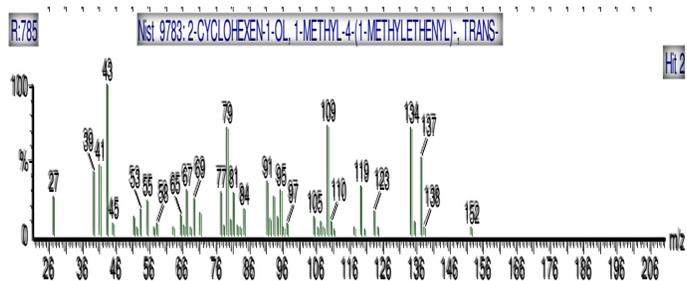


Figura 17. Espectro de la estructura de 2-ciclohexen-1-ol, 1-metil-4-(1-metiletenil)-, trans-

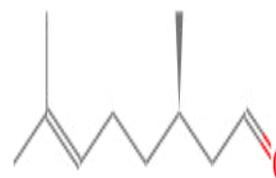
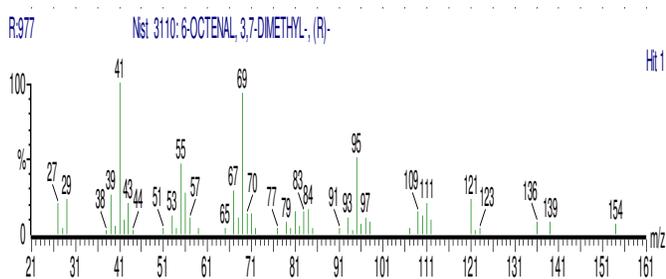


Figura 18. Espectro de la estructura de 6-octenal, 3,7-dimetil-, (R)-

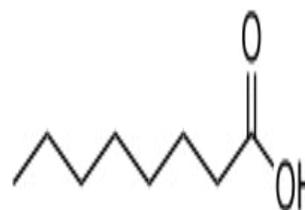
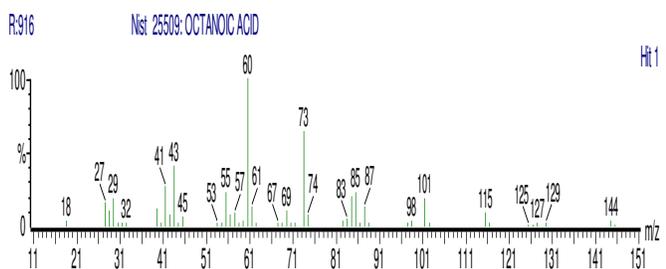


Figura 19. Espectro de la estructura del ácido octanoico

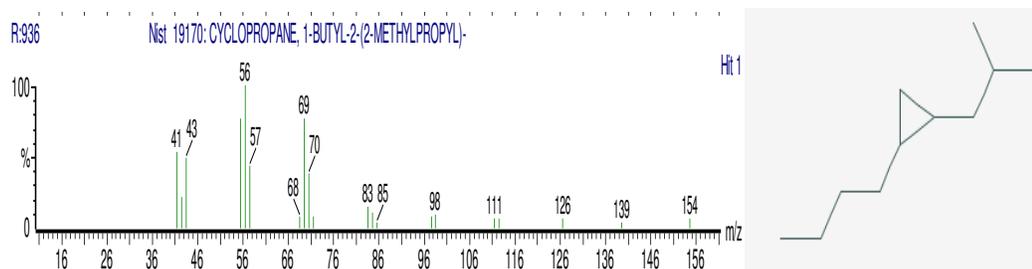


Figura 20. Espectro de la estructura de cyclopropane, 1-butyl-2-(2-methylpropyl)-

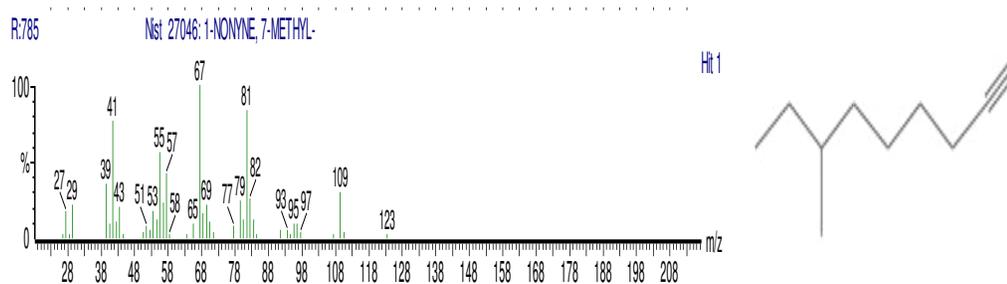


Figura 21. Espectro de la estructura de 1-nonyne, 7-methyl-

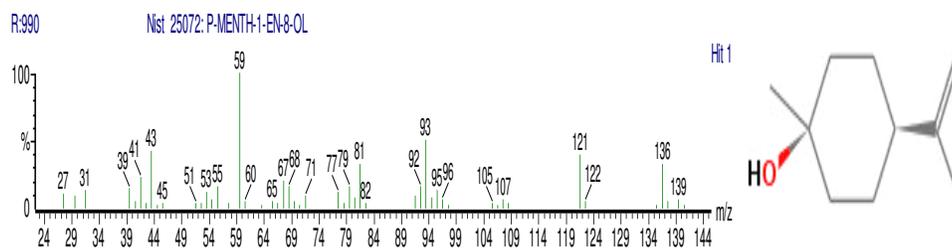


Figura 22. Espectro de la estructura de p-menth-1-en-8-ol

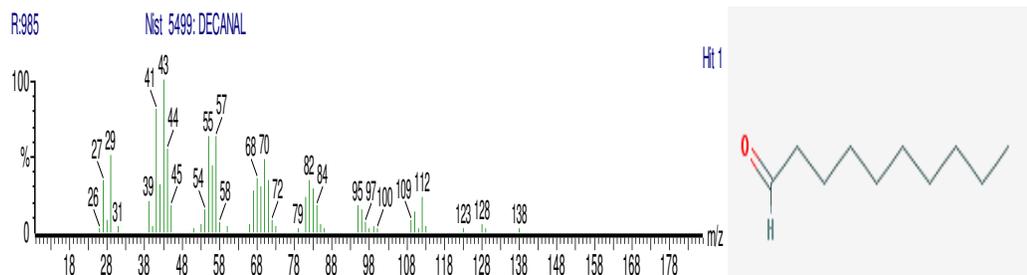


Figura 23. Espectro de la estructura de decanal

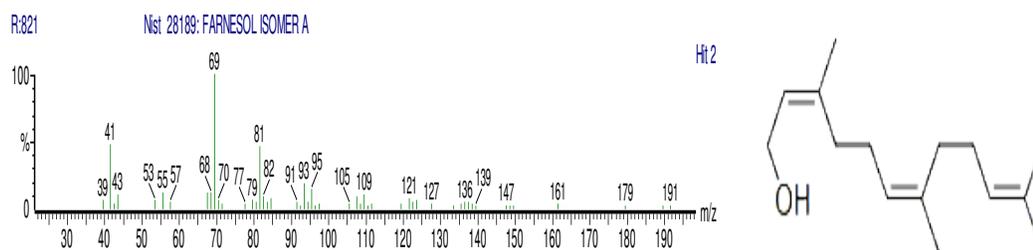


Figura 24. Espectro de la estructura de farnesol isómero A

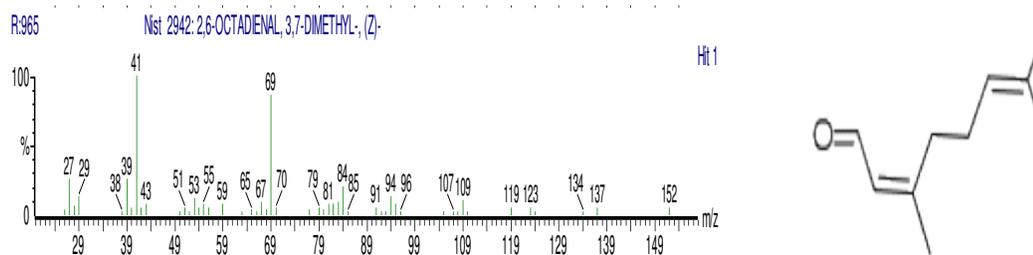


Figura 25. Espectro de la estructura de 2,6-octadienal, 3,7-dimethyl-(z)- /Beta citral

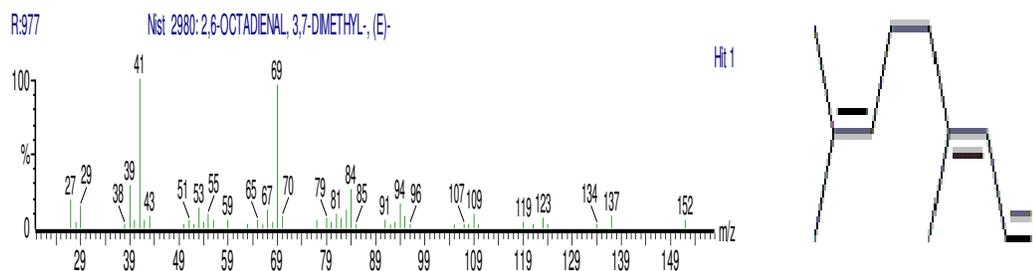


Figura 26. Espectro de la estructura de 2,6-octadienal, 3,7-dimethyl-,(E) / alfa citral

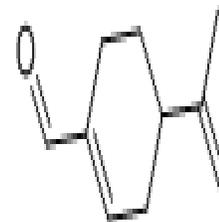
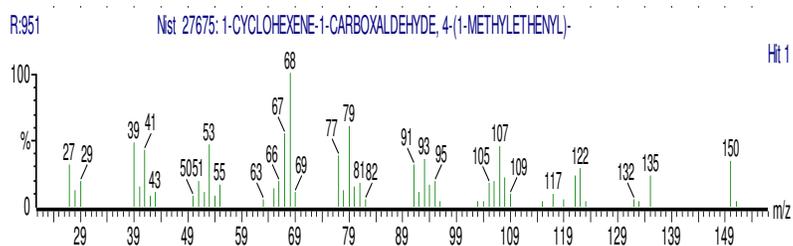


Figura 27. Espectro de la estructura de 1-ciclohexene-1-carboxaldehyde,4-(1-methylethenyl)- /Peryllaaldehyde

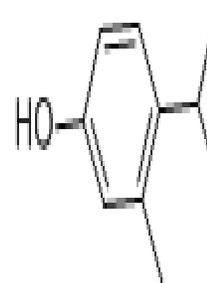
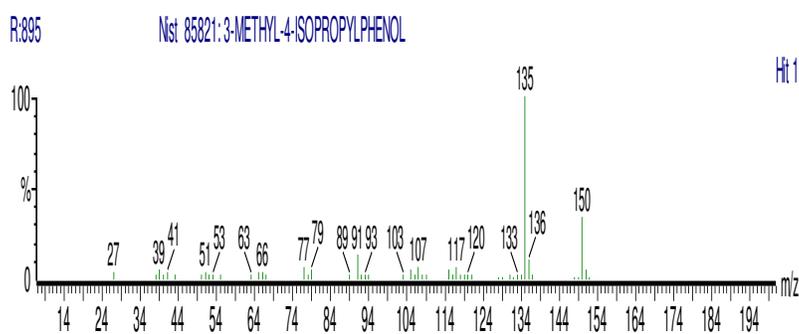


Figura 28. Espectro de la estructura de 3-methyl-4-isopropylphenol / p-timol

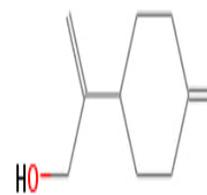
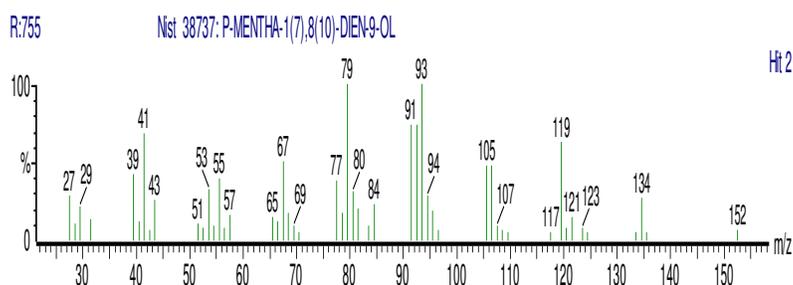


Figura 29. Espectro de la estructura de p-mentha-1(7), 8(10)-dien-9-ol

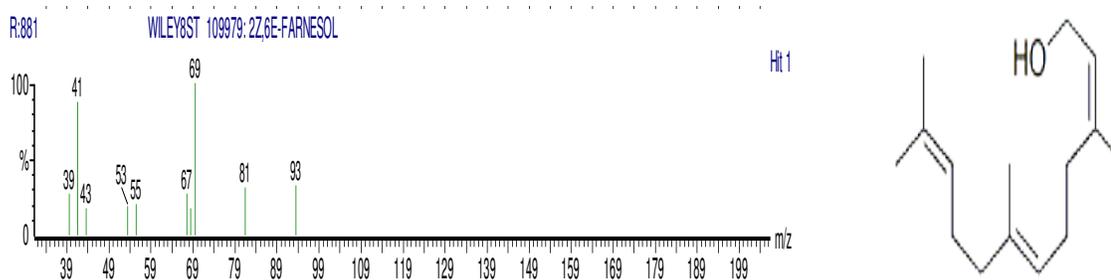


Figura 30. Espectro de la estructura de 2z,6e-farnesol

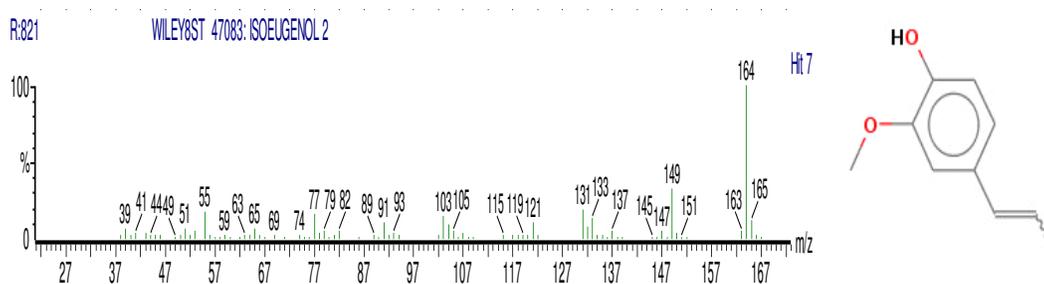


Figura 31. Espectro de la estructura de isoeugenol 2

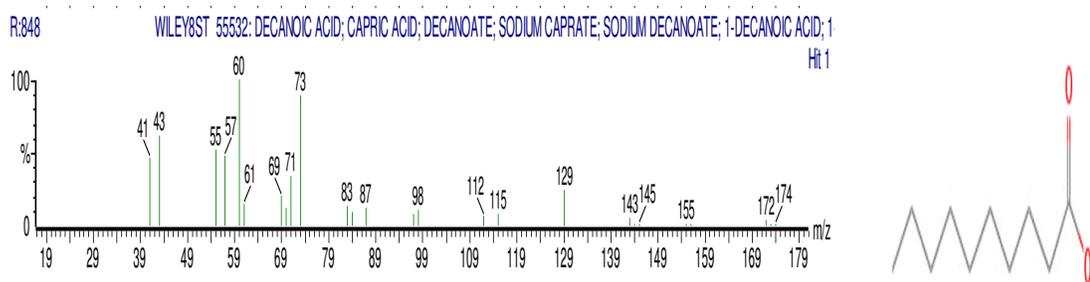


Figura 32. Espectro de la estructura de decanoic acid

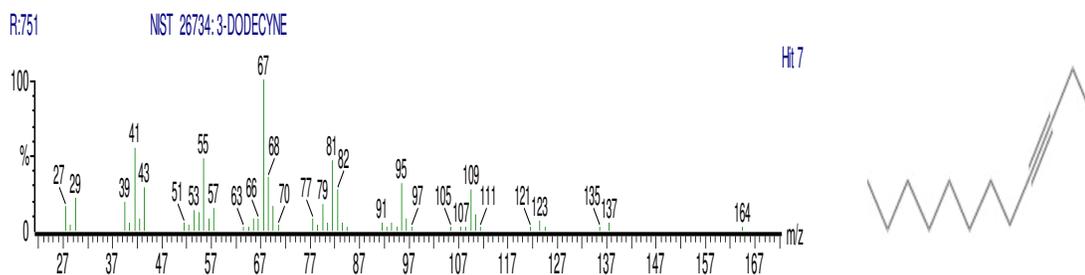


Figura 33. Espectro de la estructura de 3-dodecyne

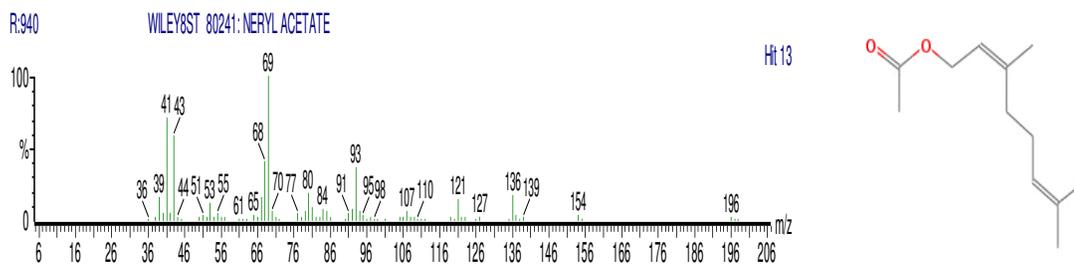


Figura 34. Espectro de la estructura de acetato de nerilo

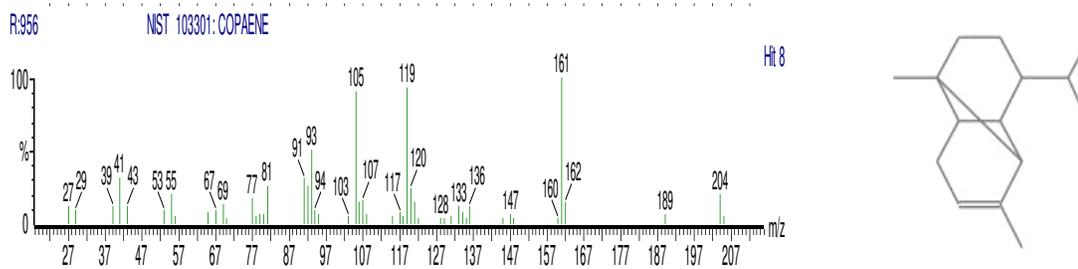


Figura 35. Espectro de la estructura de copaeno

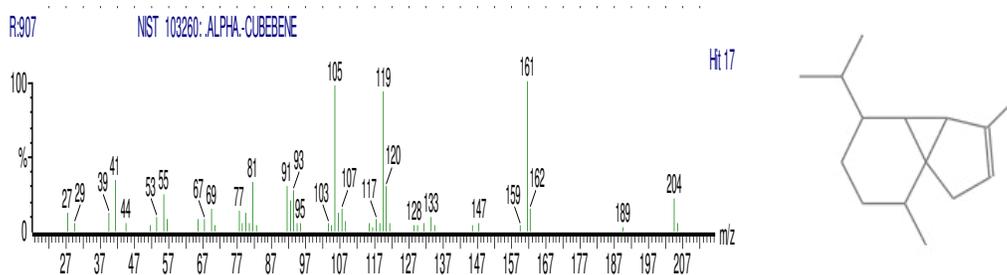


Figura 36. Espectro de la estructura de alpha-cubebene

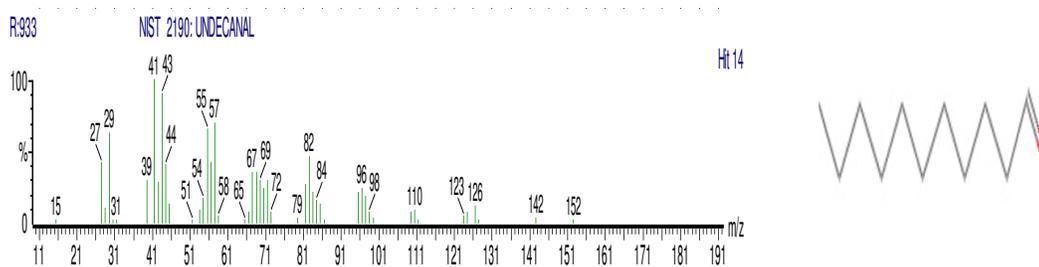


Figura 37. Espectro de la estructura de undecanal

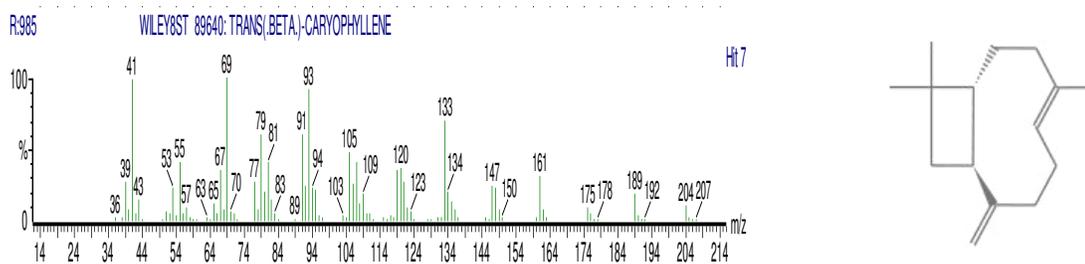


Figura 38. Espectro de la estructura de trans (beta)-cariofileno

4.1.4 Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad.

4.1.4.1 Captación del radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH) del aceite esencial de toronja

Los resultados obtenidos de la capacidad del radical DPPH del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad comparado con el trolox se presentan a continuación:

Tabla 3. Resultados de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad

Concentración de <i>Citrus paradisi</i> Macfad ($\mu\text{L} / \text{mL}$)	Absorbancia (promedio)	% Inhibición	IC 50 ($\mu\text{L} / \text{mL}$)
0	0.501	0	
12.5	0.387	22.90	
25	0.297	40.72	33.2
50	0.142	71.74	
100	0.043	91.49	

Fuente: Elaboración propia

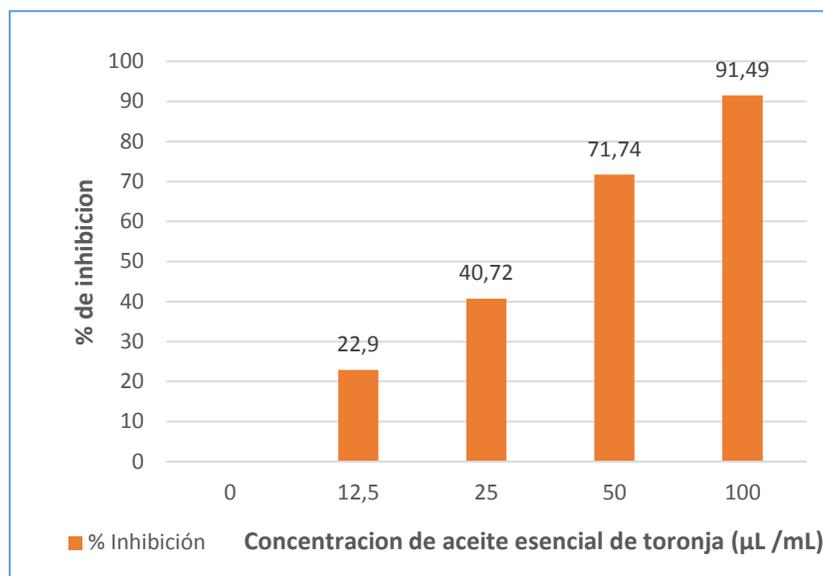


Figura 39 : % de Inhibición del radical DPPH frente al aceite esencial de *Citrus paradisi Macfad*

Fuente: Elaboración propia

De lo anterior podemos decir:

IC 50 de *Citrus paradisi* con DPPH es 33,2 µL/mL

Para hacer la respectiva equivalencia de la cantidad de gramos del aceite que equivalen a gramos de Trolox se determinó la densidad del aceite esencial de *Citrus paradisi* de 0,852 g /mL (método de picnómetro).

Entonces :

33,2 µL ----- 1mL

0,852 g-----1000 µL

X ----- 33,2 µL X = 38,96 x 10⁶µg

Por lo tanto: IC 50 de *Citrus paradisi Macfad* con DPPH es 38,96 x 10⁶ µg/mL y

IC 50

de Trolox ® con DPPH es 3,8 µg/mL

4.1.5 Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad frente a *Streptococcus mutans*

Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la tabla 4. (ver fotos en el anexo 5)

Tabla 4. Formación de halos de inhibición de *Streptococcus mutans* en agar Mueller Hinton, empleando el método de difusión en agar.

MUESTRA	Concentración del Aceite esencial Toronja (mg)- (% concentración)	<i>Streptococcus mutans</i> (Halos de inhibición en mm)
	85,2 (100 %)	> 50
	42,6 (50 %)	> 50
Aceite esencial de toronja	21,3 (25 %)	> 50
	10,65 (12,5 %)	21
	5,32 (6,25%)	20
	2,66 (3,125 %)	17
Etanol		Inactivo
Ciprofloxacino 5 µg		25

Fuente. Elaboración propia

DISCUSIÓN

A partir de 25 Kg de cáscara se obtuvo 33 mL de aceite esencial. Estos valores indican un rendimiento de 0,13 mL% v/p. Dicha proporción se encuentra óptima para los procesos industriales de extracción del aceite esencial de toronja, cuyos rendimientos por el método de hidrodestilación oscilan entre 0,01 hasta 0,5 mL aceite / Kg toronja (Günther, 1973).

En el análisis organoléptico el pH de los jugos varían según la especie de los frutos, se han reportado valores de 2 para limones y hasta 5 para mandarinas, naranjas y toronjas (Agusti, 2003). El valor de la acidez obtenida en este estudio fue 5,9.

El índice de refracción obtenido a 21°C fue 1,351, resultado inferior a lo encontrado por Pino et al. (1999) a 25 °C de 1,4692 y por Gunther (1973) a 25 °C de 1,4755, debemos considerar que de acuerdo a lo reportado por Pérez (2006), los aceites esenciales poseen un índice de refracción elevado, con un promedio de 1,5.

La densidad obtenida del aceite esencial de la cáscara de toronja a 21°C de 0,852 g/mL, siendo cercano a lo reportado por Pino et al. (1999) de 0,8433 y por Gunther (1973) de 0,858 g/mL.

Por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (CG/EM), Se han elucidado 34 compuestos según lo reportado en la Tabla 2, conformados en mayor proporción por monoterpenos como alfa-pineno, beta-pineno, beta-myrceno, D-limoneno, sesquiterpenos destacando como farnesol isómero A, trans (beta)-cariofileno, alfa-cubeneno, aldehídos como nonanal, decanal, hidrocarburos como 4-metil-1,5-heptadieno, un fenilpropanoide como isoeugenol-2, los resultados corresponden a la composición química de los aceites esenciales del género *Citrus* conformados principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos. (Dugo, et al., 2002; Oborhofer, et al., 1999; Pino y Sanchez, 2000; Viuda-Martos, et al., 2009).

Según los reportes de otros estudios en aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi* Macfad muchos de los compuestos encontrados en el aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi* Macfad son comunes como por ejemplo α -pineno, o-cimeno, beta cariofileno, copaeno y D-limoneno, siendo este último en mayor proporción, sin embargo también podemos encontrar compuestos reportados por primera vez como β -mirceno, α -terpineno, isopulegol, quercivorol, α -citral y β -citral entre otros (Poiana et al., 1998; Pino et al., 1999; Bousbia et al., 2009; Soto, 2010).

En el ensayo de la capacidad captadora de radical DPPH del aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi* Macfad no presenta actividad antioxidante frente al patrón estándar Trolox ® este resultado es contradictorio porque el aceite esencial presenta monoterpenos como α -terpineno y d-limoneno que poseen actividad antioxidante (Wei y Shibamoto, 2007; Conforti et.,al, 2007). Algunos estudios indican que los aceites esenciales del género *Citrus* mostraron poder antioxidante similar al Trolox ®; la actividad antioxidante es explicada por la presencia de terpinolona, terpineno (Choi et al., 2000), d-limoneno, alfa-pineno y beta pineno estos dos últimos también fueron encontrados en el aceite esencial del presente estudio (Malhotra et al.,2009; Misharina y Samusenko, 2008).

Considerando los resultados del IC50 entre el aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi* Macfad comparada con el patrón Trolox ®, podemos decir que según la composición química no encontramos al bergaptol ni bergamotina dentro de los compuestos químicos reportados, que según el estudio realizado en el jugo y el aceite esencial de la cáscara de Toronja se demuestra la actividad antioxidante utilizando el método de DPPH, indicando al bergaptol, como el compuesto bioactivo responsable (Girenavar et al., 2007) y en otro estudio se indica que la Bergamotina es una furocoumarina con propiedades antioxidantes presente en mayor proporción en el jugo que en la cáscara (Manthey AJ y Buslig BS, 2005), posiblemente estos dos componentes al momento de la extracción por hidrodestilación no se hayan obtenido o la

especie de *Citrus paradisi* Macfad utilizada en el presente estudio no las presente por factores climáticos y edáficos.

En la actividad antibacteriana los resultados muestran que el aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad presenta actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* a las concentraciones de 25%, 50%, 100% que equivalen a 21,3 mg; 42,6 mg; 85,2 mg respectivamente de aceite esencial de toronja.

La actividad antimicrobiana de las mezclas químicas complejas que constituyen los aceites esenciales ha llevado a intentos de identificar y aislar los componentes activos antimicrobianos activos. En muchos casos, los componentes o fracciones responsables de la actividad antibacteriana se han identificado como terpinen-4-ol en *Malaleuca alternifolia* (árbol de tè) (Carson et al., 2002), carvacrol y timol en aceite de *origanum vulgare* (orégano) (Lambert et al., 2001), y carvacrol y eugenol en el aceite de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) (Chaieb et al., 2007).

La actividad antimicrobiana del limoneno y α - terpineno, puede atribuirse a que producen efectos en la integridad de membrana de las bacterias u hongos en consecuencia inhiben la respiración y afectan el proceso de transporte de iones (Martins et. Al, 2000)

La mayoría de aceites esenciales al menos poseen actividad antibacteriana limitada, con algunos de los componentes que presentan un mayor grado de actividad. Estudios de la actividad antibacteriana de los constituyentes de los aceites esenciales han indicado consistentemente que los aldehídos y los fenoles presentan mayor actividad antibacteriana que otros tipos de constituyentes (Ultee et. al, 2002), seguido de los alcoholes no fenólicos y los hidrocarburos que poseen una menor actividad antibacteriana (Delaquis et al, 2002; Mayaud et al., 2008; Carson y Riley, 1995; Inouye et al.,2001; Peñalver et al., 2005).

CONCLUSIONES

1. En la cáscara del fruto de *Citrus paradisi* Macfad “Toronja”, se identificaron los siguientes componentes químicos: alfa-pineno, beta-pineno, beta-myrceno, d-limoneno, O-cimeno, gamma-terpineno, cis-linalol oxido, terpineol, cis-beta, quercivorol, isopulegol, cis-beta-terpineol, terpineol, alfa-citral, beta-citral, p-mentha-1(7), 8(10)-dien-9-ol, p-timol; farnesol isómero A, trans (beta)-cariofileno, alfa-cubeneno, copaeno, 2z,6e-farnesol; ácido octanoico, ácido decanoico; nonanal, decanal, 1-cyclohexeno-1-carboxialdehido, undecanal; un alcohol como 1-Octanol; un éster como Neril-acetato; 4-metil-1,5-heptadieno, ciclopropano, 1-butyl-2-(2-metilpropil), 1-nonino 7-metil, 3-dodecine; un fenilpropanoide como isoeugenol-2, siendo el d-limoneno el de mayor concentración.
2. En el ensayo de la capacidad captadora de radical DPPH, los resultados indican que *Citrus paradisi Macfad* no posee actividad antioxidante frente al patrón estándar de Trolox ®.
3. Se determinó que el aceite esencial de toronja presenta actividad antibacteriana significativa frente a *Streptococcus mutans* a concentraciones de 25%, 50% y 100% respectivamente que equivalen a 21,3 mg; 42,6 mg; 85,2 mg de aceite esencial de la cáscara de toronja.

RECOMENDACIONES

1. Estudiar el efecto inhibidor del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad “toronja” frente a otras bacterias de importancia estomatológica.
2. Realizar trabajos de investigación donde se estudie el efecto inhibidor del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad “toronja” frente a bacterias Gram negativas.
3. Estudiar otras formas de determinación de la capacidad antioxidante para analizar más a fondo el comportamiento del aceite esencial *Citrus x paradisi* Macfad “toronja”.
4. Elaborar otros estudios donde se prueben diferentes concentraciones del aceite esencial *Citrus paradisi* Macfad “toronja” en comparación al ciprofloxacino frente a *Streptococcus mutans* para hallar su concentración mínima inhibitoria.
5. Realizar mayores estudios sobre el mecanismo de acción que tienen los componentes del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad “toronja” con relación a su efectividad antimicrobiana.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- A.O.A.C. 2000. Association of Oficial Analitycal Chemists. Washington, D.C. E.U.A. v.11.
- Agapito, T., y Sung, I. (2003). Fito Medicina 110 Plantas Medicinales. Edición 1. Lima: Editorial Isabel IRL.
- Aguilera, G., Padilla, P., Aguilar, R., Frausto, S., Aceves, C y Salaires, E. (2004). Niveles de *Streptococcus mutans* y prevalencia de caries dental en una población de escolares de la zona urbana de la ciudad de Zacatecas. Revista ADM,61(3), 85-91.
- Agustí, M. (2003). Citricultura. Edición 2. Madrid, España: Ed. Mundi-Prensa, Madrid. pp. 121-219.
- Agustí M., A. Martínez F., C. Mesejo., J. Morian. y V. Almela. (2003). Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica Valencia. Edit. Generalitat Valenciana. pp. 8-10.
- Agusti, M. (2003). Citricultura. 2da Edición. España.Editorial Aedos. p. 85-86.
- Alam, M., Bristi, J., Rafiquzzaman, M. (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal, 21, 143.
- Amorós, M. (2003). Producción de agrios. Ed. Mundi-Prensa. pp. 79-106.
- Amórtegui, I. (2001). El cultivo de los cítricos. Modelo educativo para el desarrollo tecnológico de la comunidad rural. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. PRONATA. Ibagué, Colombia.
- Avello, M. y Suwalsky, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea 494 (II), 161-172.
- Beck, F., Beck, E. (1984). Anticariogenic effects of tea in rats. J. Dent. Res, 63 (5), 658-660.

- Beckel, R., Kingnert, H., Lundgren B., Hall, G., y Walter, G. (1985). Effect of maillard reaction products on the stability of minced herring in frozen storage. *J. Food. Sci.*, 50, 501-502.
- Bousbia, N., Vian, M., Ferhat, M., Meklati, B. y Chemat, F. (2009). A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*, 90, 409-413.
- Brand, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, 25-30.
- Burt, S. (2004). Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., Ruiz, J. (2008). Actividad antimicótica In vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). *Rev. Per Med Exp. Salud Pública*, 25(3), 298-301.
- Carhuapoma YM. (2007). *Composición química actividad antioxidante anti Helicobacter pylori y antioxidante del aceite esencial de Satureja brevicalyx Epling "urqu muña"*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
- Carson, C.F. and Riley, T.V. (1995) Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 264–269.
- Carson, C.F., Mee, B.J. y Riley, T.V. (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 1914–1920.
- Cerpa, M. (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización. (Tesis Doctoral). Universidad de Valladolid. España
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T. et al. (2007) The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review.

- Phytother. Res., 21, 501–506.
- Choi, H.S., Song, H.S., Ukeda, H., and Sawamura, M. (2000). Radical scavenging activities of *Citrus* essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J Agric Food Chem.*, 48, 4156–61.
- Conforti, F., Statti G.A., Tundis R., Loizzo M.R. and Manichini, F. (2007). *In vitro* activities of *Citrus medica* cv. Diamante (Diamante citron) relevant to treatment of diabetes and Alzheimer's disease. *Phytotherap. Res.*, 21, 427-433 (2007).
- Coy, C. y Acosta, E. (2013). Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Rev Cubana Plant Med*, 18(2), 237-246.
- Cronquist, A. (1988). The evolution and classification of flowering plants. 2ª edición. New York Botanical Garden, Bronx.
- Cvitkovitch, D.G., Li, Y., Ellen, R.P. (2003). Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(11), 1626-1632.
- Davies, F., y Albrigo, L. (1994). *Citrus*. CAB International. UK. 254p.
- De Koning, A.J. (2002). The antioxidant ethoxyquin and its analogues: a review. *International Journal of Food Properties*, 5(2), 451-461.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B. and Mazza, G. (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.*, 74, 101–109.
- Depeng, W.; Cederbaum, A,. (2003). Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research & Health*, 27(4), 277-284.
- Dugo, G. y Di Giacomo, A. (2002). The Genus *Citrus*. Primera Edición. UK: Taylor & Francis Publishing. p. 201-317.

- Dugo, G., Cotroneo, A., Verzera, A. and Bonaccorsi, I. 2002. Composition of the Volatile Fraction of Cold-pressed Citrus Peel Oils, In: "Citrus. The Genus Citrus", (Eds.): Dugo, G. and Di Giamo, A. CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Duraffourd, C., D' hervicourt, L., La praz, J.C. (1983) Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1º edición. París: editorial Masson SA.
- Escribano, M., Matesanz, P. (2005) Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. Avances en Periodoncia e Implantología Oral,17(2), 79–87.
- Fehér, J., Csomós, G., Vereckei, A. (2001). Free radicals reactions in medicine. Berlin, Heidelberg: Spring – Verlag.
- Ferrazano, G., Ivana, A., Ingenito A., De Natale A., Pollio A. (2009). Anticariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cacao, coffee, tea), J. Fitoterapia,80, 255-262.
- Fleschin, S., Fleschin, M.; Nita, S.; Magearu, V. (2000). Free radicals mediated proteins oxidation in biochemistry. Roum. Biotechnol, Lett. 5(6), 479-795.
- Font Quer, P. (1982). Diccionario de Botánica. 8ª reimpresión. Barcelona: Editorial Labor, S. A.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. Citrus fruit Statistics 2015. Rome.
- Gaitán, J. (2002). Situación de la citricultura del estado de Nuevo León. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM). Monterrey, Nuevo León. México. 168 pp.
- Girenavar, B., Jayaprakasha, G.K., Jadegoud, Y., Nagana, G.A., and Patil B.S. (2007). Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergaptol and geranylcoumarin from grapefruit. Bioorg Med Chem,15(11), 3684–91
- Granados, C., Yáñez, X., Santafé, G. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus* y

- Minthostachys mollis* del norte de Santander. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Pamplona – Colombia, 10(1), 12-23.
- Grinsted, M. (1994). Types of antioxidants and their historical background. Boletín técnico N° 13, Dinamarca.
- Günther, E. (1973). The Essential Oils. Vol. 1: History and origin in Plants Production Analysis. Krieger Publishing: New York, USA.
- Huang, D. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem, 53(6), 1841-56.
- Hung, W.C., Tsai, J.C., Hsueh, P.R., Chia, J.S., Teng, L.J. (2005). Species identification of mutans streptococci by groESL gene sequence. Journal of medical microbiology, 54(9),857–62.
- Inouye, S., Takizawa, T. and Yamaguchi, H. (2001) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. J. Antimicrob.Chemother., 47, 565–573.
- International Life Sciences Institute. (1996). Antioxidants : scientific basis, regulatory aspects and industry perspectives. Summary of workshop held 8-9 february.
- Koompirojn, K., Guay, M., Peawchana, W., Suesuwan, A., Ingkasate, A. (2001). Inhibition of lactic acid polysaccharide formation of *Streptococcus mutans* by tea extracts in vitro. CU Dent. J, 24,195-202.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J. and Nychas, G.J.E. (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol., 91, 453–462.
- Linossier, A.C., Valenzuela, C.Y. (2011). Colonización de la cavidad oral por *Streptococcus* grupo mutans, según edad, evaluado en saliva por un método semi-cuantitativo. Rev Chil Infect, 28(3), 230–237.
- Lock, O. (1988). Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de

productos naturales PUCP Fondo editorial. Perú.

Loussert, R. (1992). Los Agrios. Ed. Mundi-Prensa Madrid. 175-192 p.

Malhotra, S., Suri, S., and Tuli, R. (2009). Antioxidant activity of citrus cultivars and chemical composition of Citrus karna essential oil. *Planta Med*, 75(1),62–64.

Manthey,AJ ; Buslig, BS. (2005). Distribution of furanocoumarins in grapefruit juice Fractions.*Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 53, 5158-5163.

Martínez, J., Gutiérrez A., Molina, A., García,E., y Rodríguez, J. (2010). Fertilización en cítricos en el estado de Nuevo León. *Fac. Agronomía, UANL. Escobedo, N.L. México*, pp. 1-30.

Martins, R., Salgueiro, M., Goncalves, R., Vila, F., Tomi, T., and Casanova, J. (2000). Antimicrobial activity and chemical composition of the bark oil of *Croton stellulifer*, an endemic species from S Tome e Principe, *Planta Med.*, 66, 647–650.

Masada, Y., (1997). *Analysis of Essential Oils by gas chromatography and Mass spectrometry*, Ed, John Wiley, N.Y, 330 p.

Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A. and Aubert, G. (2008) Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.*, 47, 167–173.

Milicich, G. (2008). Caries: Una perspectiva de la enfermedad oral que nos esforzamos por manejar. *J Minim Interv Dent*. 108(1), 25–35.

Miller E. *Fisiología Vegetal*. (1967). 1º Edición. México D.F.: Editorial Centro Regional de Ayuda Técnica, 111-114.

Mingzhen, D. y Jiankai, Z., (2012). Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic- mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edile oils. *Food Chemistry*, 131, 1051-1055.

Misharina, T.A., and Samusenko, A.L. (2008). Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their

- mixtures. Prikl Biokhim Mikrobiol, 44(4),482–6.
- Moon, J.K.; Shibamoto. 2009. T. Antioxidant assays for plant and food components. J. Agric. Food Chem., 57, 1655-1666.
- Moromi, N.H., Martinez, C.E. (2006). Efecto del té verde en la formación de la placa bacteriana por *Streptococcus mutans*. Rev. Odontología San Marquina, 9 (2), 23-24.
- Morton A. y D. Proebst. (2003). Organic citrus resource guide. Soil and Health Association of NZ.New Zealand. p. 9.
- Nadell, C.D., Xavier, J.B., Levin, S. a Foster, K.R. (2008). The evolution of quorumsensing in bacterial biofilms. PLoS biology, 6(1):14.
- Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I., Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I. (2004).Demonstration of *Streptococcus mutans* with a Cell Wall Polysaccharide Specific to a New Serotype, k, in the Human Oral Cavity. J. Clin. Microbiol., 42(1), 198–202.
- Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello, 67, 61–72.
- Nobuyoki, I., Masao, H., Katsumi, I. (2003). Antioxidants: carcinogenic and chemopreventive properties. Encyclopedia of Cancer, 1 (1), 89-101.
- Oberhofer, B., Nikiforov, A., Buchbauer, G., Jirovetz, L., and Bicchi, C. (1999). Investigation of the alteration of the composition of various essential oils used in aroma lamp applications.Flavour Fragr. J.,14, 293–299.
- Organización Panamericana de la Salud. (2014). Plan Básico de Educación Farmacéutica y Competencias del Farmacéutico para la práctica profesional. Conferencia Panamericana de Educación Farmacéutica (CPEF). Recuperado de: http://www.observatoriorh.org/sites/default/files/webfiles/fulltext/2014/ix_cpef/PlanBasico.pdf.
- Padrón-Chávez, J.E. y Rocha-Peña,M.A. (2007). Variedades comerciales

- de cítricos para Nuevo León y Tamaulipas. INIFAP. CIRNE. Campo Experimental General Terán. General Terán, N.L., México. Folleto Técnico No. 8. 55 p.
- Palacios, J. (2005). Citricultura. Tucumán/Argentina. Capital Federal. Argentina. Ed. Alfa Beta S.A.
- Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radicals Biology Med.*, 26(9),1231–1237.
- Peñalver, P., Huerta, B., Borge, C. (2005) Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, 113,1–6.
- Perez, T.F. (2006). Efectividad de los vapores de tomillo y orégano como agentes antibacterianos (Tesis de Maestría). Universidad de las Américas, Puebla, México.
- Petti, S., Cripian, S. (2009). Poliphenoles, oral health and disease: a review. *Journal of Dentistry*, 37, 413-423.
- Pino, J.; Acevedo, A.; Rabelo, J.; González, C. y Escandón, J. (1999). Chemical Composition of Distilled Grapefruit Oil. *Journal essential Oil Research*, 11, 75-76.
- Pino, J.A., and Sánchez, M. (2000). Chemical composition of grapefruit oil concentrates. *J. Essent. Oil Res.*12,167–169.
- Poiana, M., Sicari, V., y Mincione B. (1998). Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction of grapefruit flavedo. *Flavour and fragrance journal*,13, 125-130.
- Pokony J, Yanishlieva N, Gordon M. (2001). Antioxidantes de los alimentos: Aplicaciones prácticas. Zaragoza, España: Editorial Acribia
- PromPerú- Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo. (2009). Perú, Productos Agrícolas. p.17
- Rodriguez, J., Menéndez, J., Trujillo Y. (2001). Radicales libres en la

- biomedicina y estrés oxidativa. *Revista cubana Médica Militar*, 1, 36-44.
- Rodriguez-Trabado, J., Miró, B., Guspi, R. (2007). Hypersensitivity to the antioxidant ethoxyquin. *Actas Dermosifiliográficas*, 98(8), 580
- Rojas, R., Bustamante B., Bauer J., Fernández I., Albán J., Lock O. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.*, 88 (2-3),199-204
- Sampieri, R. (2014). *Metodología de la Investigación*. 6ta edición. Edit. Mc Graw Hill Education.
- Sasse, A., Colindres, P., Brewer, M. (2009). Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of cooked, frozen pork patties. *J. Food Sci*, 74(1), 30-35.
- Shahidi, F., Janitha P, Wanasundara P. (1992). Phenolic Antioxidants. *Crit Rev Food Sci*, 32(1), 67-103
- Shayegh, S., Rasooli, I., Taghizadeh, M., Astaneh, S. (2008). Phytotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque. *Nat. Prod Res*, 22(5),428-39.
- Soler, A., y Soles F. (2006). *Cítricos. Variedades y técnicas de cultivo*. Ed. Mundi-Prensa. pp. 151-169.
- Soto, L. (2010). *Composición y actividad microbiana del aceite esencial de toronja* (Tesis de pregrado). Universidad del Zulia. Venezuela.
- Soto, L., Ojeda, G., Rojas, L., Sulbarán, B., Peña, J., Berradre, M., Fernandez, V. (2013). Caracterización química del aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi* L.) *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 30, 266-283.
- Souza, V., Driessnack, M., Costa, I. (2007). An overview of reseach designs relevant to nursing: Quantitative research designs. *Rev Latino-Am Enfermagem.* ,15(5), 684-688.
- Tafur, G., Martínez, J., Stashenko, E. (2005). Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. *Rev. Colomb. Quim.*, 34(1), 43-55.

- Thompson, W. (1981) Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. 1ª Edición. Barcelona: Editorial Blume; 119.
- Ultee, A., Bennik, M.H.J. and Moezelaar, R. (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1561–1568.
- Vargas, A., Bottia, E. (2008). Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y el peñón – Santander. (Tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Colombia.
- Vásquez, O., Alva, A., Marreros, J., (2001). Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 1(1), 38-42.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., and Pérez-Álvarez, J.A. (2009). Chemical composition of mandarin (*C. reticulata* L.), grapefruit (*C. paradisi* L.), lemon (*C. limon* L.) and orange (*C. sinensis* L.) essential oils. *J. Essen. Oil Bear. Plants*, 12(2), 236–243.
- Wei and Shibamoto. (2007). Antioxidant activities of volatile constituents of various essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 1737-1742.
- Weyemi, U. and Dupuy, C. (2012). The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 7, 77-81.

ANEXOS

ANEXO 1



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

CONSTANCIA N° 224 -USM-2014

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

La muestra vegetal (fruto), recibida de **Guillermo Fernando VILLA GONZALES**, ha sido estudiada y clasificada como: ***Citrus x paradisi* Macfad.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: SAPINDALES

FAMILIA: RUTACEAE

GENERO: *Citrus*

ESPECIE: *Citrus x paradisi* Macfad.

Nombre vulgar: "toronja"
Determinado por Blgo. Mario Benavente.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

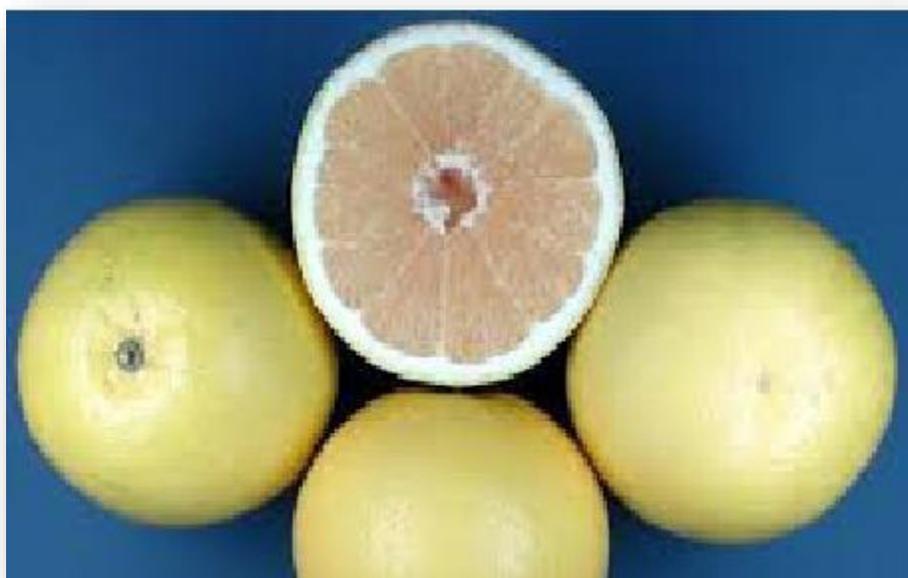
Fecha, 9 de Julio 2014



Haydee Montoya Terreros
Dña. HAYDEE MONTOYA TERREROS
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ANEXO 2

FOTO 1: FOTO DEL FRUTO DE *Citrus paradisi* “toronja”



ANEXO 3

Foto 2: Equipo extractor de aceites esenciales.

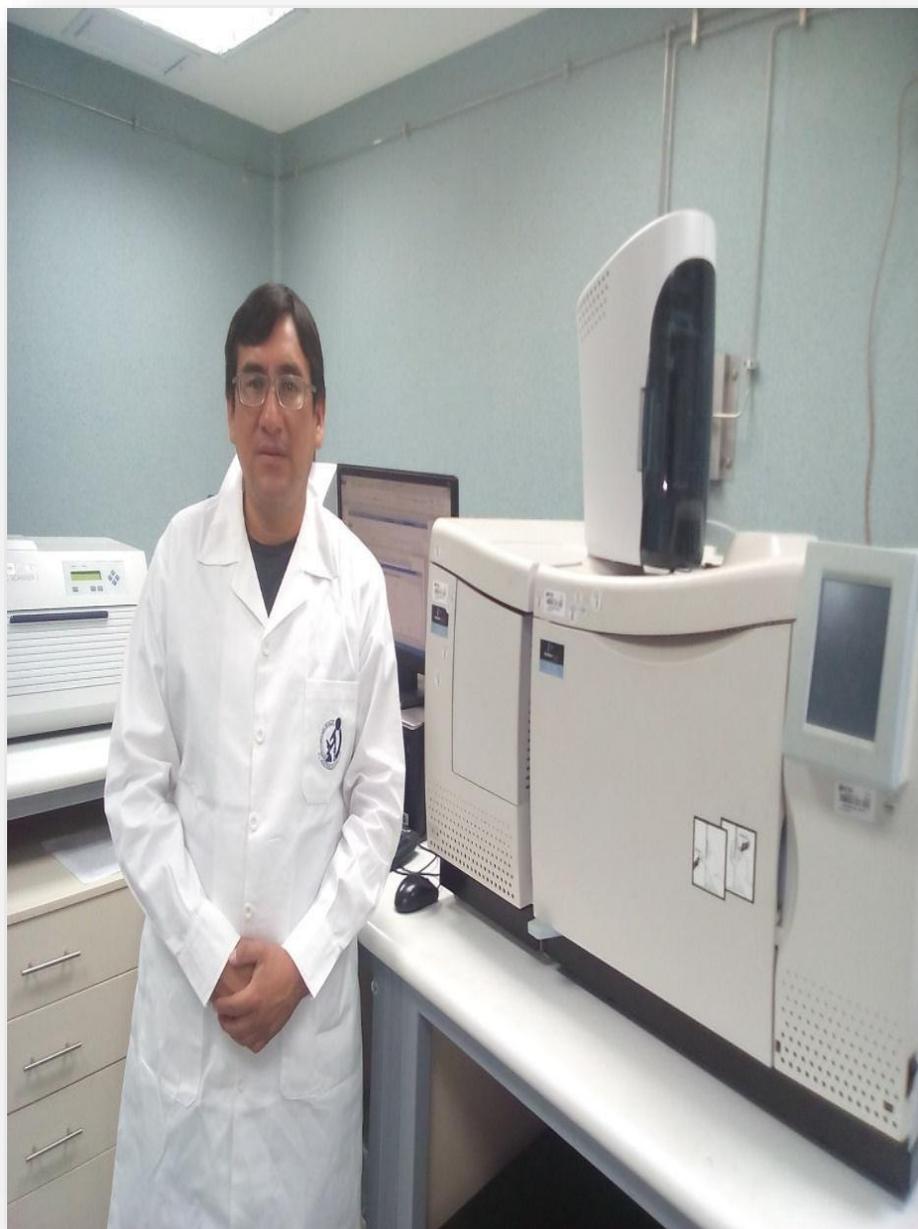
ANEXO 4

Foto 3: Investigador – Cromatógrafo de gases en Instituto de Medicina Legal del Ministerio Público

ANEXO 5

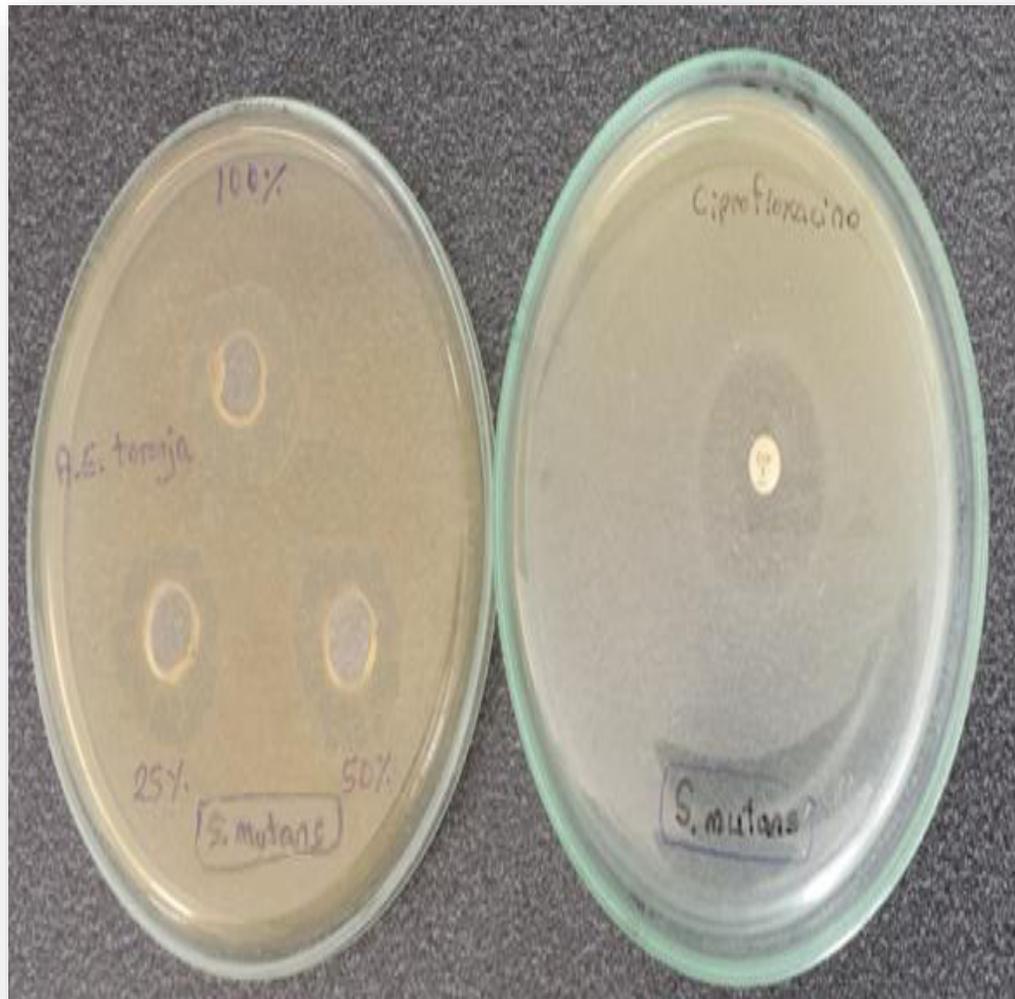


Foto 4: Aceite esencial de toronja a concentraciones de 25 %, 50%, 100% comparado con el control positivo de ciprofloxacino frente a *Streptococcus mutans*