



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente

Carrera de Ingeniería Agroindustrial

TEMA:

“ESTUDIO DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN REAL (*Citrus limonum*) EN EL CANTÓN CALUMA”.

Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniera Agroindustrial otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Ingeniería Agroindustrial.

AUTORAS:

Mariela Abigail Escobar Aguirre

Kimberly Juleysi Velasco Vargas

DIRECTOR:

Ing. Isidro Favian Bayas Morejón PhD.

Guaranda – Ecuador

2022

TEMA:

**ESTUDIO DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL
DE LIMÓN REAL (*Citrus limonum*) EN EL CANTÓN CALUMA.**

REVISADO Y APROBADO POR:

Dr. Isidro Favian Bayas Morejón PhD.

DIRECTOR

Ing. José Luis Altuna Vásquez MSc.

BIOMETRISTA

Dr. Hugo Fabian Vásquez Coloma PhD.

REDACCIÓN TÉCNICA

CERTIFICADO DE AUTORÍA



Nosotros, Mariela Abigail Escobar Aguirre con C.I. 025027941-1 y Kimberly Juleysi Velasco Vargas con C.I. 120765090-2, declaramos que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional y que las referencias bibliográficas que incluyen han sido consultadas y citadas con su respectivo autor (es).

La Universidad Estatal de Bolívar puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la ley de Propiedad Intelectual, su Reglamento y la Normativa Institucional vigente.

.....
Mariela Abigail Escobar Aguirre
C.I. 025027941-1
AUTORA

.....
Kimberly Juleysi Velasco Vargas
C.I. 120765090-2
AUTORA

.....
Dr. Isidro Favian Bayas Morejón PhD.
C.I. 020181191-6
DIRECTOR

.....
Ing. José Luis Altuna Vásquez MSc.
C.I. 180253805-6
BIOMETRISTA

.....
Dr. Hugo Fabian Vásquez Coloma PhD.
C.I. 020085252-3
REDACCIÓN TÉCNICA

20220201002P00590 DECLARACION JURAMENTADA

OTORGAN: MARIELA ABIGAIL ESCOBAR AGUIRRE Y KIMBERLY

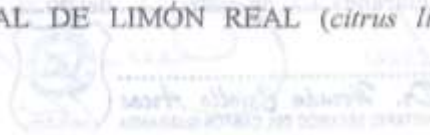
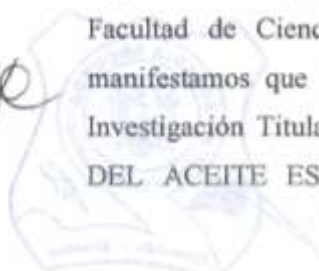
JULEYSI VELASCO VARGAS

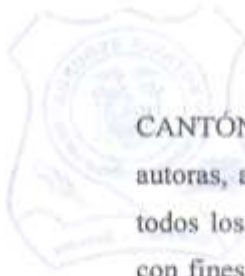
CUANTIA: INDETERMINADA

DI 2 COPIAS



En la ciudad de Guaranda, provincia Bolívar, República del Ecuador, hoy día martes diecinueve de abril de dos mil veintidós, ante mi DOCTOR HERNÁN RAMIRO CRIOLLO ARCOS, NOTARIO SEGUNDO DE ESTE CANTÓN, comparecen las señoritas Mariela Abigail Escobar Aguirre y Kimberly Juleysi Velasco Vargas, por sus propios derechos. Las comparecientes son de nacionalidad ecuatoriana, mayores de edad, ambas de estado civil solteras, domiciliadas en el Barrio Tomavela, parroquia Guanujo, cantón Guaranda y Barrio Arcángel San Miguel, cantón San Miguel, y de tránsito por este lugar, respectivamente, con celulares números: cero nueve nueve tres seis ocho cuatro uno cinco dos y cero nueve ocho cero seis uno siete seis sies siete, correo electrónico: marielaescobar73@gmail.com y kimervelasco1995@gmail.com, a quienes de conocerlas doy fe en virtud de haberme exhibido sus cédulas de ciudadanía en base a las que procedo a obtener sus certificados electrónicos de datos de identidad ciudadana, del Registro Civil, mismos que agregó a esta escritura como documentos habilitantes; bien instruidas por mí el Notario en el objeto y resultados de esta escritura de Declaración Juramentada que a celebrarla procede, libre y voluntariamente.- En efecto juramentadas que fueron en legal forma previa las advertencias de la gravedad del juramento, de las penas de perjurio y de la obligación que tienen de decir la verdad con claridad y exactitud, declaran lo siguiente: "Que previo a la obtención del Título de Ingenieras Agroindustriales, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, manifestamos que los criterios e ideas emitidas en el presente Proyecto de Investigación Titledo: "ESTUDIO DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN REAL (*citrus limonum*) EN EL





CANTÓN CALUMA”, es de nuestra exclusiva responsabilidad en calidad de autoras, además autorizamos a la Universidad Estatal de Bolívar hacer uso de todos los contenidos que nos pertenecen o parte de los que contiene esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación. Es todo cuanto tenemos que decir en honor a la verdad”. Hasta aquí la declaración juramentada que junto con los documentos anexos y habilitantes que se incorpora queda elevada a escritura pública con todo el valor legal, y que las comparecientes aceptan en todas y cada una de sus partes, para la celebración de la presente escritura se observaron los preceptos y requisitos previstos en la Ley Notarial; y, leída que le fue a las comparecientes por mí el Notario, se ratifican y firman conmigo en unidad de acto quedando incorporada en el Protocolo de esta Notaría, de todo cuanto DOY FE.

[Handwritten signature]

Mariela Abigail Escobar Aguirre
C.C. 0250279411

[Handwritten signature]

Kimberly Juleysi Velasco Vargas
C.C. 1207650902

[Handwritten signature] *[Handwritten signature]*

DR. HERNÁN RAMIRO CRIOLLO ARCOS
NOTARIO SEGUNDO DEL CANTÓN GUARANDA

Se otorgó ante mí y en fe de ello
confiero ésta ~~triple~~..... copia
certificada, firmada y sellada en 475
Guaranda, l.º de del 20.º

[Handwritten signature]
Dr. Hernán Criollo Arcos
NOTARIO SEGUNDO DEL CANTÓN GUARANDA



Document Information

Analyzed document	TESIS- Escobar- Velasco. FINAL. 12-04-2022 (2).docx (D133505675)
Submitted	2022-04-13T05:16:00.0000000
Submitted by	
Submitter email	fbayas@ueb.edu.ec
Similarity	0%
Analysis address	fbayas.ueb@analysis.arkund.com

Sources included in the report



Dr. Isidro Favian Bayas Morejón PhD.
DIRECTOR



Dr. Hugo Fabian Vásquez Coloma PhD.
REDACCIÓN TÉCNICA

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación le dedico en primer lugar a Dios quien estuvo todos los días de mi vida y me ayudo en los momentos más difíciles de mi carrera universitaria para poder afrontar las dificultades que se me han presentado y poder llegar a cumplir con mis objetivos propuestos.

A mis padres; Segundo Escobar y Clivia Aguirre, por todo el esfuerzo, sacrificio y apoyo incondicional brindado, con el que han logrado sacarme adelante, ellos han sido un pilar fundamental en mi vida académica inculcándome buenos valores y costumbres, en gran parte gracias a ellos hoy puedo ver alcanzada mi meta porque siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi vida estudiantil y por qué el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final.

A mi hermana, tíos y amigos que siempre me estuvieron brindando su apoyo, comprensión y sus consejos. A todos espero no defraudarlos y contar siempre con su apoyo sincero e incondicional.

Mariela Abigail Escobar Aguirre

DEDICATORIA

Dedico a Dios con mucho amor, mi proyecto de investigación, por regalarme; vida, salud, sabiduría y por darme la oportunidad de superarme. Gracias a él, por permitirme llegar hasta este momento especial de mi vida.

A mi mamá; Roció Vargas Garófalo, por todos sus sacrificios, esfuerzos, consejos y apoyo incondicional en todo momento, en especial este, que es mi carrera. Por enseñarme a nunca rendirme, sin importar las circunstancias de la vida. Por ser mi ejemplo mi motivación. Mi admiración total para ella.

A mi hermano; Guillermo Gilson Velasco Vargas, por ser parte de mi vida, por su amistad, confianza y por ser mi inspiración a seguir a delante.

A mis compañeros y amigos; por darme la oportunidad de conocerlos, trabajar en equipo, por los buenos momentos y los buenos consejos de motivación. Por enseñarme que en la vida existe de todo.

Kimberly Juleysi Velasco Vargas

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento a Dios por bendecirme con la vida y por darme las fuerzas para llegar hasta donde he llegado, por que hizo realidad este sueño tan anhelado.

A mis padres; Segundo Escobar y Clivia Aguirre, quienes son mi motor y mi mayor inspiración de seguir en adelante gracias por todo su amor y apoyo incondicional, sembrando en mi las ganas de superación y lucha. Gracias a mis amigos y compañeros universitarios que estuvieron en las buenas y malas luchando por lo que uno más anhela que es llegar a ser un profesional en la vida.

Agradezco también a mis profesores de la UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR, que durante toda mi carrera profesional han aportado con un granito de arena en mi formación.

Mariela Abigail Escobar Aguirre

AGRADECIMIENTO

Un sincero y merecido agradecimiento a Dios, por ser el que nunca falla e ilumina mis sueños.

Agradezco a la Universidad Estatal de Bolívar, a la Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, y a la Carrera de Agroindustrias. Por darme la oportunidad de estudiar en sus aulas y de ser una profesional.

A todos los maestros y maestras quienes forman parte de la Carrera de Agroindustrias. Por permitirme ser parte de esta familia, por impartir sus sabios y profesionales conocimientos, enseñándonos lo mejor en el campo de la investigación.

Un agradecimiento especial a los miembros del tribunal, que, con paciencia, me guiaron en este proyecto de investigación y han hecho posible el logro de mis aspiraciones. Al Dr. Favian Bayas, en calidad de Director, Ing. José Luis Altuna MSc, área de Biometrista, y Dr. Hugo Vásquez, área Redacción Técnica. Gracias a todos ellos, por haber contribuido con sus conocimientos y formar parte de mi proyecto.

Kimberly Juleysi Velasco Vargas

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág
DEDICATORIA.....	VII
AGRADECIMIENTO.....	VIII
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XVI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIX
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XX
RESUMEN.....	XXI
ABSTRACT.....	XXII
CAPÍTULO I	
1. Introducción.....	1
CAPÍTULO II	
2. Problema.....	3
2.1. Planteamiento del problema.....	3
2.2. Situación problemática.....	3
2.3. Formulación del problema.....	3
2.4. Sistematización del problema.....	4
CAPÍTULO III	
3. Marco teórico.....	5
3.1. Origen del limón.....	5
3.2. Producción de limón en Ecuador.....	5
3.3. Producción de limón en Caluma.....	5
3.4. Limón Real (<i>Citrus limonum</i>).....	6
3.4.1. Taxonomía.....	6
3.4.2. Condiciones climáticas.....	7
3.4.3. Corteza de limón.....	7

3.4.4.	Hojas de limón.....	7
3.4.5.	Composición nutricional del limón	8
3.4.5.	Composición química de la corteza del limón.....	8
3.4.6.	Compuestos fenólicos.....	9
3.4.7.	Usos agroindustriales.....	9
3.5.	Aceite esencial	10
3.5.1.	Usos y bondades	10
3.5.2.	Aceite esencial de limón.....	10
3.5.3.	Propiedades físicas de los aceites esenciales	11
3.5.4.	Propiedades químicas de los aceites esenciales.....	11
3.6.	Actividad antioxidante	11
3.6.1.	Beneficios de los antioxidantes	12
3.6.2.	Radicales libres.....	12
3.6.3.	Estrés oxidativo	12
3.7.	Actividad antimicrobiana.....	13
3.7.1.	<i>E.coli</i>	13
3.7.2.	<i>Salmonella</i>	13
3.7.3.	<i>Listeria</i>	14
3.7.4.	<i>Arcobacter</i>	15
3.7.5.	Resistencia antimicrobiana	15
3.8.	Métodos de extracción	15
3.8.1.	Destilación por arrastre de vapor.....	15
3.8.2.	Destilación fraccionada	17
3.9.	Método de actividad antioxidante.....	17
3.9.1.	Actividad antioxidante por el método de blanqueo con β -caroteno “bleaching (BCB) test”	17

3.10. Método de determinación de actividad antimicrobiana	18
3.10.1. Método de difusión disco- plata.....	18
3.11. Cromatografía de gases.....	19

CAPÍTULO IV

4. Marco metodológico.....	20
4.1. Ubicación de la investigación	20
4.2. Localización de la investigación.....	20
4.3. Situación geográfica y climática.....	20
4.4. Zona de vida. (Zonificación ecológica).....	21
4.5. Materiales.....	21
4.5.1. Material experimental.....	21
4.5.2. Materiales de oficina	21
4.5.3. Materiales de laboratorio	21
4.5.4. Equipos	22
4.5.5. Reactivos	23
4.5.6. Agares.....	23
4.5.7. Materiales para medidas de bioseguridad Covid- 19.....	23
4.6. Métodos.....	23
4.6.1. Factores en estudio.	23
4.6.2. Tratamientos	24
4.6.3. Características del experimento.....	24
4.6.4. Tipo de diseño experimental.....	24
4.7. Análisis de varianza	25
4.7.1. Pruebas de rangos múltiples	25
4.8. Metodología experimental	26
4.8.1. Recolección de la materia prima	26

4.8.2.	Preparación de muestras	26
4.9.	Métodos de extracción	27
4.9.1.	Extracción por el método de arrastre de vapor	27
4.9.2.	Extracción por el método de destilación fraccionada	28
4.10.	Rendimiento del aceite esencial	29
4.11.	Determinación de la actividad antimicrobiana y antioxidante	29
4.11.1.	Determinación de la Actividad antimicrobiana	29
4.11.2.	Determinación de la actividad antioxidante	32
4.12.	Determinación por Cromatografía de gases (GC-MSD).	33

CAPÍTULO V

5.	Resultados y discusión.....	34
5.1.	Resultados del aceite esencial obtenido por cada método de extracción.....	34
5.1.1.	Extracción por arrastre de vapor.....	34
5.1.2.	Extracción por destilación fraccionada.....	35
5.2.	Resultados del rendimiento del aceite esencial.....	35
5.2.1.	Método por arrastre de vapor.....	36
5.2.2.	Método por destilación fraccionada	37
5.3.	Determinación de la actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial	40
5.3.1.	Resultados de la capacidad de actividad antimicrobiana.....	40
5.3.2.	Resultados de la capacidad de actividad antioxidante	48
5.4.	Resultados de los compuestos volátiles por cromatografía de gases del aceite esencial obtenido	55

CAPÍTULO VI

6.	Comprobación de hipótesis	59
6.1.	Hipótesis nula (H ₀)	59
6.2.	Hipótesis alterna (H ₁).....	59

6.3. Verificación de la hipótesis para las propiedades bioactivas.....	59
CAPITULO VII	
7. Conclusiones y recomendaciones.....	60
7.1. Conclusiones.....	60
7.2. Recomendaciones.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63
ANEXOS.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°	DESCRIPCIÓN	Pág
Tabla 1.	Producción agrícola en el cantón Caluma.	5
Tabla 2.	Composición taxonómica	6
Tabla 3.	Composición nutricional.....	8
Tabla 4.	Composición físico- química apropiada de la corteza de limón.....	8
Tabla 5.	Localización de la investigación fase 1	20
Tabla 6.	Localización de la investigación fase 2	20
Tabla 7.	Parámetros climáticos fase 1	20
Tabla 8.	Parámetros climáticos fase 2	21
Tabla 9.	Factores de estudio para la obtención de aceite esencial de limón real.....	24
Tabla 10.	Combinación de tratamientos	24
Tabla 11.	Características del diseño experimental	24
Tabla 12.	Análisis de varianza (ADEVA).	25
Tabla 13.	Resultados de la extracción del aceite esencial de limón Real (<i>Citrus limonum</i>).	34
Tabla 14.	Resultados de la extracción del aceite esencial de limón Real (<i>Citrus limonum</i>).	35
Tabla 15.	Resultados del rendimiento del aceite esencial por el método de arrastre de vapor.	36
Tabla 16.	Resultados del rendimiento del aceite esencial por el método de destilación fraccionada.....	37
Tabla 17.	Análisis de varianza del rendimiento.....	37
Tabla 18.	Prueba de Tukey con un 95% de confianza para el factor A en el rendimiento.	38
Tabla 19.	Prueba de Tukey con un 95% de confianza para el factor B en el rendimiento.	39
Tabla 20.	Resultados de los diámetros (mm) de halos de inhibición de la capacidad antimicrobiana de aceites obtenidos frente a <i>Escherichia coli</i>	40

Tabla 21. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para la capacidad de actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i>	41
Tabla 22. Resultados de los diámetros (mm) de halos de inhibición de la capacidad antimicrobiana de aceites obtenidos frente a <i>Salmonella</i>	42
Tabla 23. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para la capacidad de actividad antimicrobiana contra <i>Salmonella</i>	43
Tabla 24. Resultados de los diámetros (mm) de halos de inhibición de la capacidad antimicrobiana de aceites obtenidos frente a <i>Listeria</i> sp.....	44
Tabla 25. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para la capacidad de actividad antimicrobiana contra <i>Listeria</i>	45
Tabla 26. Resultados de los diámetros (mm) de halos de inhibición de la capacidad antimicrobiana de aceites obtenidos frente a <i>Arcobacter</i> sp.	46
Tabla 27. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para la capacidad de actividad antimicrobiana contra <i>Arcobacter</i>	47
Tabla 28. Resultados de la capacidad antioxidante (% de peróxido secuestrado) de los aceites obtenidos.....	48
Tabla 29. Análisis de varianza de la capacidad de actividad antioxidante de los aceites obtenidos a una concentración de 50 mg/mL.	49
Tabla 30. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para el factor A en la capacidad de actividad antioxidante.....	50
Tabla 31. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para el factor B en la capacidad de actividad antioxidante.....	51
Tabla 32. Análisis de varianza de la capacidad de actividad antioxidante de los aceites obtenidos a una concentración de 100 mg/mL.	52
Tabla 33. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para el factor A en la capacidad de actividad antioxidante.....	52
Tabla 34. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para el factor A en la capacidad de actividad antioxidante.....	53

Tabla 35. Compuestos volátiles del aceite esencial de hojas de limón Real por destilación fraccionada.....	56
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	DESCRIPCIÓN	Pág
Figura 1.	Fruto de limón Real (<i>Citrus limonum</i>).....	6
Figura 2.	Vista microscópica de <i>Escherichia coli</i>	13
Figura 3.	Vista microscópica de <i>Salmonella</i>	14
Figura 4.	Vista microscópica de <i>Listeria</i>	14
Figura 5.	Vista microscópica de <i>Arcobacter</i>	15
Figura 6.	Equipo de destilación por arrastre de vapor.....	16
Figura 7.	Equipo de destilación fraccionada.	17
Figura 8.	Esquema de los elementos presentes en el Cromatografía de gases.	19
Figura 9.	Relación del Factor A (materia prima) con el rendimiento.	38
Figura 10.	Relación del Factor B (métodos de extracción) con el rendimiento.	39
Figura 11.	Relación del Factor A (materia prima) con la capacidad de acción antioxidante.	50
Figura 12.	Relación del Factor B (métodos de extracción) con la capacidad de actividad antioxidante	51
Figura 13.	Relación del Factor A (materia prima) con la capacidad de actividad antioxidante.	53
Figura 14.	Relación del Factor B (métodos de extracción) con la capacidad de actividad antioxidante	54
Figura 15.	Cromatograma del aceite esencial de las hojas de limón Real por destilación fraccionada.....	55

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°	DESCRIPCIÓN	Pág
Anexo 1.	Mapa de investigación.	75
Anexo 2.	Resultados de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.	76
Anexo 3.	Resultados de la capacidad de actividad antioxidante en los aceites esenciales.	80
Anexo 4.	Resultados de los compuestos volátiles del aceite esencial de hojas de limon Real por Cromatografía de gases.	81
Anexo 5.	Fotografías de la fase experimental.	84
Anexo 6.	Destilación por arrastre de vapor.	85
Anexo 7.	Destilación fraccionada.	86
Anexo 8.	Análisis de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.	86
Anexo 9.	Análisis de actividad antioxidante de los aceites esenciales.	89
Anexo 10.	Análisis de compuestos volátiles en los aceites esenciales por Cromatografía de gases.	90
Anexo 11.	Glosario de términos.	91

RESUMEN

En la presente investigación se procedió a realizar el estudio de la acción antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial de la corteza y las hojas de limón Real (*Citrus limonum*), extraídas por el arrastre de vapor y destilación fraccionada, por lo mencionado el objetivo de la investigación fue realizar un estudio de dos métodos de extracción de aceite esencial de limón Real (*Citrus limonum*) en el cantón Caluma. Esta variedad de limón es desconocido comercialmente y existe escasa evidencia científicamente de sus propiedades bioactivas. El aceite esencial extraído en mayor volumen fue de la corteza por arrastre de vapor 2,15 mL, por ende presenta un mayor rendimiento, para determinar las propiedades bioactivas (actividad antimicrobiana y antioxidante), se evaluó la actividad antimicrobiana con bacterias aisladas de *E coli*, *Salmonella*, *Listeria* y *Arcobacter*, en la que presenta actividad antimicrobiana para las cepas de *Listeria* y *Arcobacter*, para la actividad antioxidante se realizó mediante el método de Blanqueo β -caroteno, en la cual se demostró a una concentración de 50 mg/mL un valor de 48,82% y a una concentración de 100 mg/ mL un valor de 47,29% peróxido secuestrado, se caracterizó cromatográficamente el aceite esencial de limón Real del mejor tratamiento y el compuesto Sabinene se idéntico en el pico de mayor intensidad. El aceite esencial de limón Real en la presente investigación posee propiedades antimicrobianas y antioxidantes.

Palabras claves: Aceite esencial, arrastre de vapor, destilación fraccionada, antimicrobiana, antioxidante, cromatografía de gases.

ABSTRACT

In the present research we proceeded to study the antimicrobial and antioxidant action of the essential oil of the rind and leaves of Royal lemon (*Citrus limonum*), extracted by steam entrainment and fractional distillation, therefore the objective of the research was to study two methods of extraction of essential oil of Royal lemon (*Citrus limonum*) in the Caluma canton. This variety of lemon is commercially unknown and there is little scientific evidence of its bioactive properties. To determine the bioactive properties (antimicrobial and antioxidant activity), the antimicrobial activity was evaluated with bacteria isolated from *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* and *Arcobacter*, in which it presents antimicrobial activity for the strains of *Listeria* and *Arcobacter*, For the antioxidant activity was performed by the Bleaching β -carotene method, which showed at a concentration of 50 mg/mL a value of 48.82% and at a concentration of 100 mg/mL a value of 47.29% peroxide sequestered, the essential oil of Royal lemon of the best treatment was characterized chromatographically and the Sabinene compound was identical in the peak of greater intensity. The essential oil of Royal lemon in the present investigation possesses antimicrobial and antioxidant properties.

Key words: Essential oil, vapor entrainment, fractional distillation, antimicrobial, antioxidant, gas chromatography.

CAPÍTULO I

1. Introducción

Los cítricos se los considera como uno de los cultivos de gran importación a nivel mundial debido a que se los cultiva en más de 140 países. La gran limitante en la producción de estos son las enfermedades causadas por diferentes plagas como la *Phytophthora* spp., *Mycosphaerella citri*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Candidatus Liberibacter* spp, entre otros (Sáenz et al, 2019).

La agroproducción en el Ecuador es muy variada, siendo los cítricos como el limón consumido por gran parte de la población, los beneficios de este cítrico son ampliamente conocidos pues ayudan a reforzar el sistema inmunológico y además combaten las células canceras en los seres humanos. De las variedades existentes en la actualidad el limón Real (*Citrus limonum*) es cultivado ampliamente en la provincia Bolívar, centrándose su producción en la zona subtropical como: Las Naves, Echeandía, Caluma y Balsapamba (Solano, 2018).

Existen diferentes métodos para obtener aceites esenciales a partir de diferentes materias primas, el principio de estos es la separación y purificación de los componentes de una determinada mezcla, estas metodologías también se emplean para aislar compuestos orgánicos. En el proceso de extracción de aceites esenciales generalmente se producen dos fases siendo la primera la orgánica y a continuación la acuosa de acuerdo a sus solubilidades relativas, obteniendo así el producto esperado además de restos del material original junto con productos secundarios y disolvente (Ventura, 2017).

A medida que la tecnología se ha ido desarrollando y el cuidado con el medio ambiente ha tomado un peso de gran relevancia las metodologías para la extracción de aceite esencial han sufrido grandes procesos de transformación pues garantizan la calidad de los productos, siendo esto la extracción por arrastre de vapor una metodología amigable con el

ambiente al utilizar disolventes orgánicos, la destilación fraccionada posee una mayor eficacia puesto que al encontrarse con puntos de ebullición muy cercanos, una de las características es la utilización de columnas de destilación dispuestas de algún material que permita la transferencia de materia y energía en cada una de las etapas (Román et al, 2016).

Dentro de la investigación se planteó los siguientes objetivos específicos:

- Extraer aceite esencial a partir de la corteza del fruto y las hojas de limón Real (*Citrus limonum*), mediante arrastre de vapor y destilación fraccionada.
- Analizar estadísticamente el rendimiento de los aceites obtenidos.
- Evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante de los aceites esenciales.
- Caracterizar cromatográficamente el aceite esencial obtenido.

CAPÍTULO II

2. Problema

2.1. Planteamiento del problema

Al limón Real procedente del cantón Caluma se lo desconoce comercialmente y los consumidores locales aprovechan el zumo de este fruto y desechan la cascara, debido a que existe escasa información sobre sus propiedades bioactivas que podrían brindar tanto la cascara como las hojas.

Los aceites esenciales extraídos de los cítricos se obtienen en bajas cantidades debido a que los métodos convencionales de extracción son deficientes, tanto por su rendimiento como por su pureza, debiendo utilizar otro método para separar el solvente del producto.

Los aceites esenciales además de poseer propiedades bioactivas como antimicrobiano y antioxidante que se puede utilizar en industrias farmacéuticas y en la industria alimentaria como productos funcionales, se emplean también para la elaboración de licores, perfumes, artículos de aseo, como enmascaradores de olores de pinturas y caucho.

2.2. Situación problemática

Existe poca evidencia científica de las propiedades antimicrobiana y antioxidantes que posee el aceite esencial del limón Real (*Citrus limonum*), además, los rendimientos en los métodos de extracción son deficientes.

2.3. Formulación del problema

Para la presente investigación se planteó la siguiente pregunta:

¿Posee propiedades bioactivas el aceite esencial del limón Real (*Citrus limonum*) procedente del cantón Caluma y que método de extracción es más eficiente?

2.4. Sistematización del problema

Para llevar a cabo la investigación y llegar a cumplirse el objetivo principal se plantearon las siguientes preguntas:

¿Cuál es el método más eficiente para la extracción de aceite esencial de la corteza del fruto y las hojas de limón Real (*Citrus limonum*)?

¿Poseen actividad antimicrobiana y antioxidante los aceites esenciales obtenidos del limón Real (*Citrus limonum*), tanto de la corteza como de las hojas?

¿Qué compuestos posee el aceite esencial de limón Real (*Citrus limonum*), y cuales actúan como antimicrobiana y antioxidante?

CAPÍTULO III

3. Marco teórico

3.1. Origen del limón

Es originario del sureste de India, norte de Birmania y China, se dio a conocer entre los siglos III y IV, descrito en el tratado de Agricultura Nabathae. El cultivo del limón en el hemisferio occidental se realizó después de la conquista musulmana de la península Ibérica, extendiéndose por todo el mediterráneo gracias al clima de estas zonas (Nestares & Panéz, 2019).

3.2. Producción de limón en Ecuador

Según la FAO, Ecuador en el año 2010 y 2011 se produjeron 115,2 y 100,6 mil TM de productos cítricos. Datos tomados del Banco Central del Ecuador, señalan que se exportó 6.622 toneladas métricas entre limón Tahití, rugoso, sutil, y lima y a diferentes partes del mundo (Santistevan, 2016).

3.3. Producción de limón en Caluma

La producción de limón en Caluma no supera el 3% ya que no es rentable porque su principal cultivo es la naranja, lo cual es la mayor fuente de ingreso para los agricultores.

Tabla 1. Producción agrícola en el cantón Caluma.

Productos	Porcentaje
Café	11,11%
Yuca	30,56%
Plátano	30,56%
Naranja	8,33%
Papa China	5,56%
Mandarina	2,78%
Pastizal	8,33%
Limón	2,78%
Total	100,00%

Fuente: (Calderón , 2017).

3.4. Limón Real (*Citrus limonum*)

El limón Real o limón rugoso es un fruto mediano, de forma variable pero generalmente ovalado. Con un pequeño surco o collar en la zona de inserción del pedúnculo; y un pequeño pezón en el ápice rodeado por una aureola hundida e irregular. El epicarpio es rugoso, maduro de color amarillo pálido (Garavello et al, 2019).

Figura 1. Fruto de limón Real (*Citrus limonum*).



Fuente: (Veliz, 2015).

3.4.1. Taxonomía

Tabla 2. Composición taxonómica

Taxonomía (<i>Citrus limonum</i>)	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Sapindales
Familia	Rutaceae
Subfamilia	Citroideae
Tribu	Citreae
Genero	<i>Citrus</i>
Especie	<i>Limonum</i>
Nombre común	Limón rugoso, limón real.

Fuente: (Inga, 2017).

3.4.2. Condiciones climáticas

El limón Real o limón rugoso es un cultivo del grupo de cítricos de muy buena adaptación a diversos tipos de suelos, tolerando suelos pesados y salinos, este proporciona un árbol excepcionalmente vigoroso y productivo desde edades tempranas con buena calidad de fruta, se adapta bien a los suelos ligeros, con buen drenaje y a suelos con pH alto; tolera brevemente la inundación, pero no crece bien en suelos con excesiva humedad permanente, su sistema radicular es profundo por lo que en suelos profundos es más productivo y soporta mejor los periodos secos (Llamoca, 2017).

3.4.3. Corteza de limón

Aguilar & Del Castillo (2020), menciona que la corteza del limón es generalmente gruesa, posee una superficie rugosa y una tonalidad amarilla pálida cuando ha alcanzado su madurez fisiológica. Del mismo modo Llamoca (2017), define de color verde oscuro a la corteza durante su desarrollo, gradualmente van tomándose verde claro o amarillo cuando comienza la sobre maduración o envejecimiento. La fruta tiene 10 a 12 segmentos con pulpa de grano fino de color amarillento verdoso pálido, muy ácida y aromática.

3.4.4. Hojas de limón

Las hojas de limón son un importante residuo de poda que es beneficiosa para reducir las emisiones de metano de los rumiantes debido a que contiene aceites esenciales, estas cuentan con propiedades anti-bacterianas y anti-inflamatorias luchando contra problemas de estreñimiento, flatulencia y diarrea (Huanca , 2018).

Según Llamoca (2017), describe a las hojas jóvenes de árboles sanos que son enteras de color verde pálido, y a las hojas de los arboles maduros que son verdes oscuros; con una longitud de 4 a 13 cm, unifoliadas y gruesas; presentan pecíolos alados, de forma ovalada a elíptica y glándulas que contienen aceites.

3.4.5. Composición nutricional del limón

Tabla 3. *Composición nutricional*

Valor nutricional	
% Carbohidratos	13,04
% Humedad	84,71
% Fibra cruda	0,75
% Grasas	0,24
% Proteínas	1,36
% Cenizas	0,65
K (mg/100g)	147,57
Mg (mg/100g)	8.922
Ácido pantoténico (vit. B ₅)	0,19 mg (4%)
Vitamina B ₆	0,08 mg (6%)
Vitamina C	53 mg (88%)
Ca (mg/100g)	60,69
Hierro (mg/100g)	<0,25
Fosforo	16 mg (2%)

Fuente: (Estrada et al, 2018).

3.4.5. Composición química de la corteza del limón

Tabla 4. *Composición físico- química apropiada de la corteza de limón.*

Nutriente	Cantidad
Fibra	11 g
Proteínas	1,5 g
Calcio	134 mg
Vitamina C	129 mg
Vitamina B6 (Piridoxina)	0,17 mg
Riboflavina (Vitamina B2)	0,08 mg
Ácido Pantoténico (Vitamina B5)	0,32 mg
Flavonoides, pectinas (sustancias vegetales secundarias)	Muchos

Fuente: (Cordova & Velasquez , 2021).

3.4.6. Compuestos fenólicos

Corteza.- Una gran cantidad de fibra soluble se encuentra en la corteza del limón, posee pectina que se ubica en la parte inferior de la corteza. También se encuentran los fitonutrientes, al monoterpeneo d-limonoides se le atribuye beneficios para combatir algunas variantes de cáncer (Talavera, 2018).

Hojas.- Los compuestos fenólicos presentes en las hojas están en grandes cantidades, además de estos poseen ácidos fenólicos, flavonoides, taninos condensados, por lo que su consumo y utilización es de gran aporte para el cuidado de la salud y prevención de enfermedades que afectan al sistema nervioso, así como también enfermedades gastrointestinales. Por sus propiedades y principios activos es utilizado a gran escala en industrias relacionadas a la cosmetología, perfumería, farmacéutica y alimenticia. Las propiedades químicas de las hojas dependen de gran manera de la diversidad genética, hábitat y labores culturales empleados (Luna et al, 2019).

3.4.7. Usos agroindustriales

El limón es una fruta ácida, de color amarillento que se le atribuye grandes propiedades benéficas para la salud, una de ellas es su acción antioxidante y elevado contenido de vitamina C.

Según Álvarez & Cueva (2020), menciona que las partes de mayor utilidad y sus aplicaciones tenemos:

Cáscara. - Obtención de aceites esenciales para fines medicinales, terapéuticos y cosméticos, también se los utiliza para la producción de papel y cartón ya que es un gran sustituto de la madera.

Zumo. - Se lo utiliza en la Industria de néctares, licores y como aromático ya que se lo incorpora a una gran gama de productos de limpieza e inciensos.

Hojas. – Posee gran cantidad de aceites esenciales para fines medicinales, terapéuticos y cosméticos, se lo utiliza para obtener sus principios activos.

3.5. Aceite esencial

Generalmente llevan el nombre del cual se los extrae, siendo su principal característica el olor. Los aceites presentan diferentes condiciones y características, siendo líquidos y aromáticos, semi-líquidos o sólidos; estos poseen varios componentes activos y volátiles, generalmente son extraídas de: capullos, flores, semillas, hojas, hierbas, cortezas, raíces, y frutas (Butnariu & Sarac, 2018).

3.5.1. Usos y bondades

Generalmente los aceites esenciales pueden ser administrados internamente por ingestión, externamente a través de la piel como masaje, baño y fricción, también se lo utiliza para el cuidado de la piel, en cosméticos como faciales, compresas, mascarillas, lociones, y cremas, sus usos dependen de sus componentes mayoritarios y la presencia o ausencia de dichos compuestos van ligados a las condiciones geobotánicas, método de almacenamiento del material vegetal, método de cultivo, época de recolección de la planta, método de obtención del aceite y edad de la planta (Caballero & Rodriguez, 2019).

El aceite esencial se lo aplica como inhibidor microbiano debido a sus componentes para eliminar agentes patógenos como la *E. coli*, *Salmonella typhmuri*, *S. aureus*, *Campylobacter*, *Enterococcus fecalis*, *Listeria monocytogenes* (Lin et al, 2016).

3.5.2. Aceite esencial de limón

Generalmente los aceites esenciales de los cítricos se los obtiene de las cáscaras, son mezclas de sustancias lipofílicas, volátiles, fragantes, incoloras, líquidas y caramelizadas, los aceites esenciales que se obtienen a partir de las cáscaras de limón son usadas

principalmente para dar sabor a alimentos como bebidas, también se los usa en la industria farmacéutica, perfumería y cosmetológica (Herrera et al, 2019).

3.5.3. Propiedades físicas de los aceites esenciales

Son líquidos a temperatura ambiente, son en gran parte volátiles, posee una densidad menor a la del agua, además su índice de refracción es elevado. Al igual que mayoría de aceites estos son poco solubles en agua sin embargo entre estos existen compuestos aromáticos que si se disuelven en el agua, también existen aceites esenciales solubles en alcoholes, aceites fijos y grasas (Delgado, 2018).

3.5.4. Propiedades químicas de los aceites esenciales

La determinación o evaluación de las propiedades químicas de los aceites esenciales depende de la especie o materia base de la cual se la extrae, generalmente contienen entre 50 a 300 componentes químicos, perteneciendo estos a diferentes grupos como los hidrocarburos terpénicos que son metabolitos secundarios presentes en resinas, alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres, ésteres, aceites esenciales y demás sustancias aromáticas pudiendo ser cíclicos, alifáticos o aromáticos (Scalvenzi et al, 2016).

3.6. Actividad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos químicos que las células utilizan para neutralizar a los radicales libres y de esta manera desactivarlos, disminuyendo el estrés oxidativo para evitar la oxidación de las proteínas, los lípidos y el ADN. Los radicales libres son moléculas altamente inestables ya que poseen alto poder reactivo y para estabilizarse oxidan biomoléculas como proteínas, lípidos, polisacáridos y ácidos nucleídos produciendo el desarrollo de patologías como diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas como el Párkinson y Alzheimer, o incluso cáncer (Huet, 2017).

3.6.1. Beneficios de los antioxidantes

La inclusión de antioxidantes en los cosméticos y foto protectores se ha mostrado como la principal estrategia para prevenir la foto envejecimiento. Estas sustancias podrán neutralizar los radicales libres y evitar la rápida síntesis de mineral o proteínas, que descomponen el colágeno provocado por los rayos UV 8. Su acción está dirigida a evitar al máximo posible la descomposición de las células epidérmicas inducida por el sol, así como a una disminución del número de queratinocitos que sufren muerte celular programada causada por la exposición a la luz solar (Amores & Hernández, 2018).

3.6.2. Radicales libres

Son aquellas partículas con alta reactividad, que son aptos para interactuar con las demás moléculas a su alrededor, esto se debe a que poseen un electrón desapareado o independiente, por ende buscan la estabilidad electroquímica tomando un electrón de una molécula estable, y cuando se logra el objetivo, la molécula que tiene la transferencia de electrones aún desaparece, convirtiéndose en un radical libre, esta reacción en cadena es responsable de la destrucción de las células que lleva a su deterioro y muerte, y puede ser controlada a través del consumo de antioxidantes (Chasipanta & Chicaiza, 2016).

3.6.3. Estrés oxidativo

Esta expresión se emplea conjuntamente a los elementos radicales y no radicales en los cuales son agentes oxidativos y son transformados a radicales, el estrés oxidativo ocurre cuando hay un desequilibrio en nuestras células por el aumento en los radicales libres y una reducción de antioxidantes del sistema interno, este desajuste en el equilibrio entre los radicales libres y los antioxidantes puede dañar nuestros tejidos con el pasar del tiempo (Chasipanta & Chicaiza, 2016).

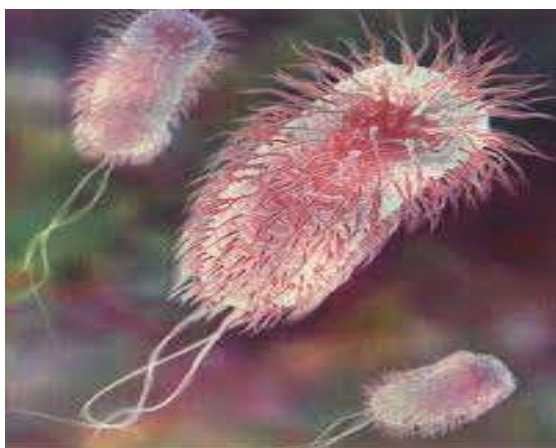
3.7. Actividad antimicrobiana

Carvajal & Vimos (2017), menciona que la actividad antimicrobiana hace referencia a la capacidad de impedir la proliferación de bacterias que causan infecciones graves y muchas causantes de la muerte de los seres humanos, los mecanismos por los que los compuestos con actividad antibacteriana inhiben el crecimiento o causan la muerte de las bacterias son muy variados, y dependen de las dianas afectadas, Algunos compuestos, aun siendo incapaces de inhibir o matar las bacterias, pueden bloquear sus mecanismos de resistencia. Según Morales (2020), considera que los antimicrobianos puede ser antibacteriano, antiviral o anti fúngico clasificándose en bactericidas o bacteriostáticos.

3.7.1. *E.coli*

Escherichia coli es una bacteria oportunista que se encuentra en el tracto gastrointestinal humano, la mayoría de estas cepas son inocuas, pero algunas pueden causar graves intoxicaciones alimentarias e infecciones como septicemia, peritonitis, abscesos, meningitis e infecciones del tracto urinario en humanos (Mamani, 2020).

Figura 2. Vista microscópica de *Escherichia coli*.



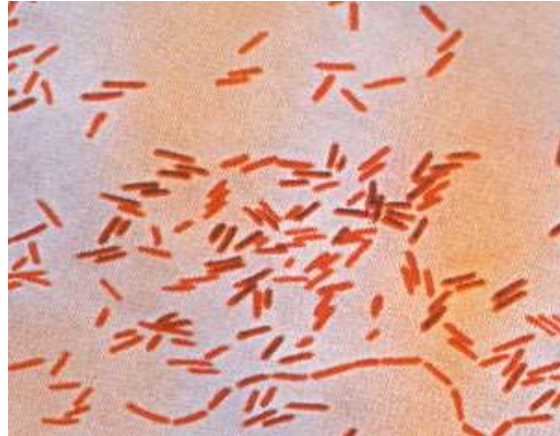
Fuente: (Alejos , 2018).

3.7.2. *Salmonella*

Salmonella es una bacteria que se puede encontrar en varios alimentos contaminados como en las carnes de pollo, cerdo, huevos, frutas y vegetales, crece en alimentos que tengan

gran contenido de proteínas; esto produce una infección que resultan en gastroenteritis, la fiebre tifoidea una enfermedad potencialmente mortal, otra fuente de contaminación son las mascotas e inclusive el agua para beber contaminada, *salmonella* es un bacilo y para su desarrollo su temperatura óptima de es 7 a 45 °C (Mora & Ramos, 2020).

Figura 3. Vista microscópica de *Salmonella*.



Fuente: (Alejos , 2018).

3.7.3. *Listeria*

Listeria es el único patógeno humano, el mismo que se puede encontrar en humanos, mamíferos, aves, plantas y suelos, causante de infecciones a neonatos, mujeres embarazadas en las que puede provocar abortos prematuros, con septicemia o meningitis; como en adultos mayores, en los que puede generar meningitis y/o encefalitis. Causa infecciones alimentarias muy violentas, estando con una tasa de mortalidad entre un 20 a 30% (Flores, 2018).

Figura 4. Vista microscópica de *Listeria*.

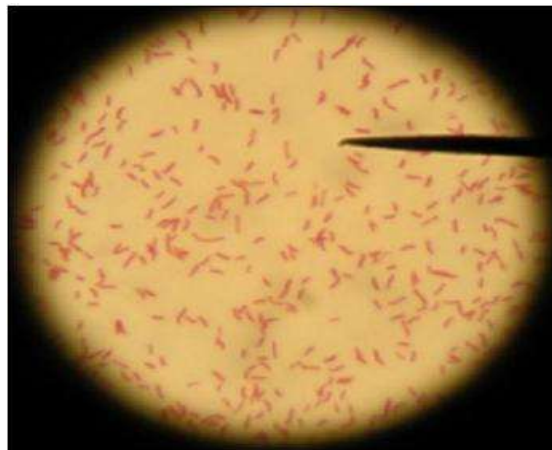


Fuente: Alemán et al, (2015).

3.7.4. *Arcobacter*

Las especies del género *Arcobacter* son bacilos gramnegativos que crecen en un intervalo de temperaturas entre 10 °C a 35 °C, este género se encuentra compuesto por 27 especies diferentes de microorganismos que han sido aislados de humanos y animales, como, de recursos ambientales como los alimentos y el agua, las infecciones causadas por *Arcobacter* son variadas, su síntoma principal es la diarrea acuosa persistente, en contraste con la diarrea inflamatoria dada por casos de infección por *Campylobacter jejuni* (Vásconez, 2019).

Figura 5. Vista microscópica de *Arcobacter*.



Fuente: (Cano, 2018).

3.7.5. Resistencia antimicrobiana

El descontrolado uso de los antimicrobianos para tratar y prevenir enfermedades, así como la promoción de estos en la crianza de animales de granja ha permitido el desarrollo de bacterias resistentes a los antimicrobianos, resultando una amenaza para la salud pública, las bacterias tienen una gran capacidad de adaptación y han desarrollado mecanismos de resistencia a la acción de los antibióticos (Rábago, 2017).

3.8. Métodos de extracción

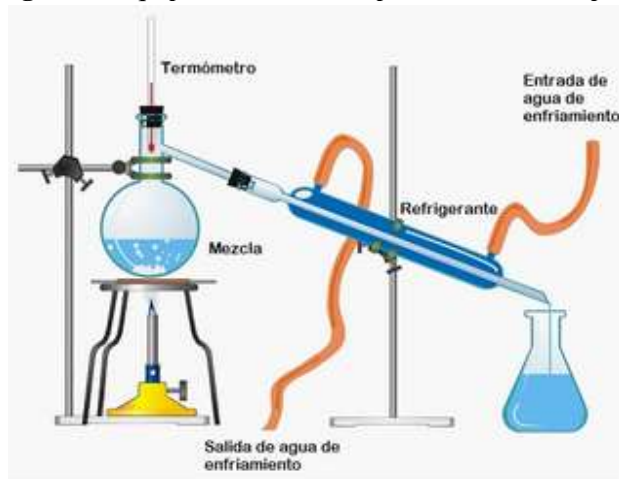
3.8.1. Destilación por arrastre de vapor

Es un método muy utilizado puesto que separa líquidos heterogéneos como es el caso del agua y del aceite, consiste en generar vapor el cual arrastra los compuestos volátiles de

los aceites para luego ser condensados y deparados. El principio básico es que cada componente ejerza su propia presión de vapor (Anguisaca, 2019).

Delgado, (2019) manifiesta que la destilación por arrastre de vapor se caracteriza por procesar una mezcla de dos líquidos inmiscibles, sometidos a vaporización a temperaturas por debajo del punto de ebullición de cada componente volátil, esto debido al flujo continuo de vapor de agua; en este proceso de una sola vez, se libera vapor, que luego pasa por un recipiente cerrado donde se encuentra el material a destilar ya cortado en trozos de corta medida. Es así como la esencia por es arrastrada por el vapor, posteriormente condensada para ser recolectada y separada de la fase acuosa.

Figura 6. Equipo de destilación por arrastre de vapor.



Fuente: (Montero , 2016).

Es el método más utilizado y consiste en generar vapor que pasará a través de material vegetal fresco, el cual cederá su calor latente a la muestra para lograr su evaporación, formando dos fases inmiscibles a lo largo de la destilación, por lo tanto, cada líquido se comportará como si el otro no estuviera presente. Es decir, cada uno de ellos ejercerá su propia presión de vapor y corresponderá a la del líquido puro a una temperatura de referencia (Vega, 2019).

3.8.2. Destilación fraccionada

Es una técnica para la obtención de diferentes sustancias, se basa en una alimentación constante del material a ser separado, con la ayuda de una columna o torre de destilación, este tipo de destilación se emplea para separar compuestos que poseen puntos de ebullición semejantes o parecidos. La obtención de los compuestos es por diferencia de densidades pues el líquido desciende mientras que el vapor asciende por la columna entrando en contacto con el líquido presente en cada sección de la columna (Gutiérrez & Tunqui, 2017).

Figura 7. Equipo de destilación fraccionada.



Fuente: (Montero, 2016).

3.9. Método de actividad antioxidante

3.9.1. Actividad antioxidante por el método de blanqueo con β -caroteno “bleaching (BCB) test”

Está sustentada mediante la oxidación de β -caroteno y ácido linoleico, la oxidación de ácido linoleico con la producción de radical peróxilo, es formado en presencia de oxidante por lo cual es el encargado de la dispersión de la cadena de radicales obtenidos de un hidrógeno o un segundo elemento de ácido linoleico o β -caroteno (Chasipanta & Chicaiza, 2016).

Según Kulisic et al, (2004), especifica que la oxidación de ácido linoleico crea radicales hidroxilo transformándolas en hidroxilos lípidos con doble enlace adyacente y productos volátiles que pueden reaccionar al mismo lapso de tiempo con el cromóforo de β -caroteno que provoca el blanqueo de la composición de reacción, el β -caroteno en deserción del antioxidante es sujeto a blanqueamiento rápida, lo que provoca un descenso en la absorbancia del medio de ensayo con el incremento de tiempo de reacción.

3.10. Método de determinación de actividad antimicrobiana

3.10.1. Método de difusión disco- plata

El antibiograma define la actividad in vitro de un antibiótico frente a un microorganismo reflejando capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria. Este método es una técnica de difusión en disco que permite, mediante lectura directa, determinar la susceptibilidad o concentración mínima inhibitoria de los antibióticos utilizando distintas concentraciones en dilución de agente antimicrobiano contra los agentes patógenos (Vásconez, 2019).

Este método consiste en depositar en una placa petri previamente inoculada con los microorganismos, discos de papel de filtro impregnados con los distintos antibióticos, tan pronto el disco de antibiótico se pone en contacto con la superficie del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar, con lo que tras 18 a 24 horas de incubación se evidenciará la inhibición o no de los microorganismos ante la presencia del antibacteriano (Suasnavas, 2017).

3.10.2. Antibióticos de control

Ciprofloxacina.- La ciprofloxacina pertenece al grupo de las quinolonas, un grupo de antibióticos sintéticos de amplio espectro cuyo “blanco” es la síntesis de ADN, han sido ampliamente utilizados para tratar infecciones tanto dentro como fuera de los hospitales, lo

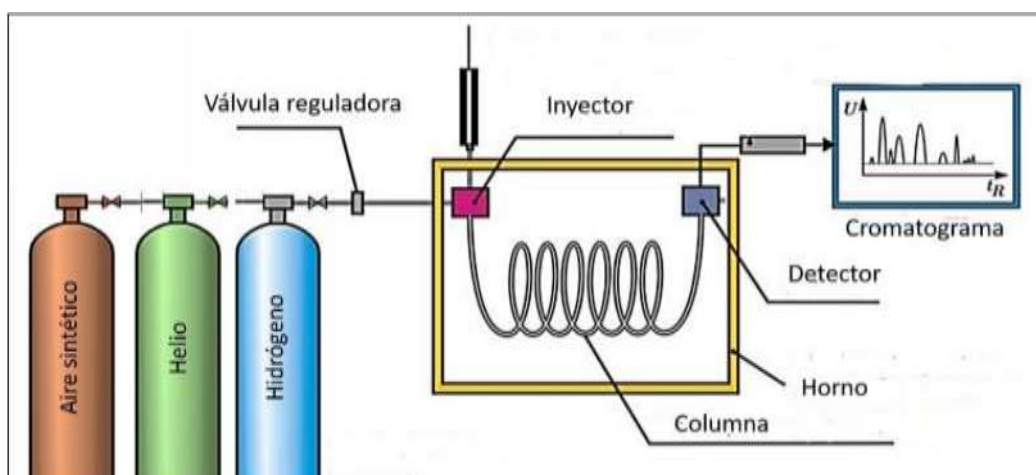
que los convierte en un recurso muy importante para los países en desarrollo debido a la amplia disponibilidad de medicamentos genéricos (Álvarez et al, 2015).

Estreptomycin.- La estreptomycin es eficaz contra las bacterias Gram negativas, *Leptospira* sp. , *Francisella tularensis* y *Yersinia pestis*, pero solo contra algunos micoplasmas y algunos estafilococos. Este es el primer antibiótico descubierto del grupo de los aminoglucósidos. También es el primer fármaco en la era de la quimioterapia que se utiliza en el tratamiento de la tuberculosis (Vásquez, 2019).

3.11. Cromatografía de gases

Es una técnica de separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles, se necesita poca cantidad de muestra para el análisis proporcionando una alta resolución, es capaz de detectar concentraciones a niveles de ppm y a menudo ppb.; esta técnica posee un amplio rango de aplicaciones como la realización de controles de calidad de productos farmacéuticos, el análisis de drogas, determinación de la presencia de contaminantes en estudios ambientales y alimentarios (Fuentes, 2019).

Figura 8. Esquema de los elementos presentes en el Cromatografía de gases.



Fuente: (Fuentes, 2019).

Según Zabaleta (2021), la cromatografía de gases debe ser empleada, cuando los componentes de la mezcla problema son volátiles o semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas de hasta 350- 400 °C, por las altas temperaturas que se manejan en el sistema.

CAPÍTULO IV

4. Marco metodológico

4.1. Ubicación de la investigación

La investigación se desarrolló en dos fases, la primera corresponde a la obtención de materia prima en el cantón Caluma, provincia Bolívar, la segunda se la llevo a cabo en las instalaciones del Laboratorio General de Laguacoto I, de la Universidad Estatal de Bolívar.

4.2. Localización de la investigación.

Tabla 5. Localización de la investigación fase 1

Ubicación	Sitio
Provincia	Bolívar
Cantón	Caluma
Sector	El Embarcadero
Dirección	Vía Montalvo Km 6

Fuente: Experimentales (2022).

Tabla 6. Localización de la investigación fase 2

Ubicación	Sitio
Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Sector	Laguacoto I
Dirección	Vía Guaranda – San Simón Km 1 ½

Fuente: Experimentales (2022).

4.3. Situación geográfica y climática.

Tabla 7. Parámetros climáticos fase 1

Parámetro	Valor
Altitud	486 msnm
Latitud	01°37'40'' Sur
Longitud	79°15'25'' Oeste
Temperatura	17 °C- 28 °C
Temperatura media anual	22,5 °C
Humedad	80%

Fuente: Experimentales (2022).

Tabla 8. *Parámetros climáticos fase 2*

Parámetro	Valor
Altitud	2.560 msnm
Latitud	01°34'15'' Sur
Longitud	79°0'02'' Oeste
Temperatura mínima	8 °C
Temperatura media anual	13 °C
Temperatura máxima	18 °C
Humedad	75%

Fuente: Experimentales (2022).

4.4. Zona de vida. (Zonificación ecológica).

La zona de vida del cantón Caluma posee características topográficas irregulares con alturas entre 210 a 1874 msnm. Su clima es variado puesto que posee zonas que van desde el frío de los páramos hasta el calor de las zonas subtropicales, con temperaturas que varían entre los 20 °C a 24 °C.

4.5. Materiales

4.5.1. Material experimental.

- Corteza del fruto: Limón Real (*Citrus limonum*).
- Hojas de limón Real (*Citrus limonum*).

4.5.2. Materiales de oficina

- Laptop
- Libreta de apuntes
- Bolígrafos
- Cámara digital
- Calculadora
- Flash memory

4.5.3. Materiales de laboratorio

- Vaso de precipitación

- Bandejas
- Cepillos
- Cuchillos
- Tijeras
- Rayador
- Esponjas de limpieza
- Papel aluminio
- Envases
- Cajas Petri
- Aza de siembra
- Erlenmeyer
- Mechero de Bunsen
- Espátula
- Tubos eppendorf
- Jarra de aneorobiosis
- Micropitetas
- Pipeta paster
- Probeta
- Hisopo
- Pinza
- Discos antibiograma
- Cubetas para espectrofotometría

4.5.4. Equipos

- Equipo de destilación por arrastre de vapor (MS-E104)
- Columna de destilación fraccionada (Quimis 180 9001)
- Balanza analítica (Radwag balances & Scales)
- Cámara de bioseguridad (Biobase)
- Vortex (Duab)
- Incubadora (Memmert)
- Refrigeradora (Indurama)
- Autoclave (Allamerican 50/X)

- Cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890A, GC System)
- Espectrofotómetro GENESYS™ Serie 10 (Thermo Electron Corporation)

4.5.5. Reactivos

- Solución de éter pH 7
- Peróxido de hidrogeno (H₂O₂) 30%
- Agua destilada (H₂O)

4.5.6. Agares

- Nutrint agar (7145A, Acumedia, USA)
- Agar Mueller Hinton (225250, BD, Francia)
- Bacto agar (214010, BD, Francia)
- Agar XLD (7166A , Acumedia, USA)
- Aloa Listeria Agar base (TM1443, TM media, India)
- Campy gen (CN0025A, Termo Scientific, USA)
- Blood Agar Base Infusión Agar (211037, BD, Francia)
- Arcobacter broth (CM0965, Oxoid, Inglaterra)

4.5.7. Materiales para medidas de bioseguridad Covid- 19

- Gel
- Alcohol
- Visor
- Mascarillas
- Guantes
- Overol anti fluidos

4.6. Métodos

4.6.1. Factores en estudio.

Para llevar a cabo la presente investigación se consideraron dos factores de estudio: Factor A, Materia prima (cascara y hojas) y factor B, Métodos de extracción (destilación por arrastre de vapor y fraccionada).

Tabla 9. Factores de estudio para la obtención de aceite esencial de limón real

Factor	Código	Niveles
Materia prima	A	a1 = Corteza a2 = Hojas
Métodos de extracción	B	b1 = Destilación por arrastre de vapor b2 = Destilación fraccionada

Fuente: Experimentales (2022).

4.6.2. Tratamientos

Tabla 10. Combinación de tratamientos

Tratamiento	Código	Niveles
T 1	a ₁ b ₁	Corteza + destilación por arrastre de vapor
T 2	a ₁ b ₂	Corteza + destilación fraccionada
T 3	a ₂ b ₁	Hojas + destilación por arrastre de vapor
T 4	a ₂ b ₂	Hojas + destilación fraccionada

Fuente: Experimentales (2022).

4.6.3. Características del experimento

Tabla 11. Características del diseño experimental

Atributos de Diseño factorial	
Número de factores	2
Número de niveles factor A	2
Número de niveles factor B	2
Número repeticiones	2
Número de unidades experimentales	8
Tamaño de unidad experimental	40 mL

Fuente: Experimentales (2022).

4.6.4. Tipo de diseño experimental

Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (D.C.A) debido a que todas las condiciones fueron controladas, donde el factor A representa a la materia prima, el factor B métodos para la extracción de aceite esencial; obedeciendo a un arreglo factorial AxB con 2 repeticiones obteniendo 8 tratamientos (2x2 x2).

Diseño estadístico

$$Y_{ijk} = u + A_i + B_j + AB_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y: variable de respuesta de la i, j, k. – ésima unidad muestral experimentada.

U: efecto de la media general

A: efecto del i- ésimo corteza y hojas de limón Real

B: efecto de la j- ésimo la técnica de extracción por Destilación por arrastre de vapor y destilación fraccionada mediante condiciones controladas.

AB_{ij}: efecto de la interacción corteza y hojas de limón Real – técnica de extracción por Destilación por arrastre de vapor y destilación fraccionada mediante condiciones controladas.

E_{ijk}: efecto del error experimental

4.7. Análisis de varianza

Tabla 12. Análisis de varianza (ADEVA).

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	F tablas
Factor A	a – 1	SC _A	SC _A /(a-1)	CM _A /CM _E	gl A/gl E
Factor B	b – 1	SC _B	SC _B /(b-1)	CM _B /CM _E	gl B/gl E
Interacción AB	(a-1)(b-1)	SC _{AB}	SC _{AB} /(a-1)(b-1)	CM _{AB} /CM _E	gl AB/gl E
Error	ab (n – 1)	SC _E	SC _E /ab(n-1)		
Total	nab – 1	SC _T			

Fuente: Experimentales (2022).

4.7.1. Pruebas de rangos múltiples

Se aplicó la prueba de Tukey con el fin de comparar las medias individuales del análisis de varianzas de las muestras sometidas a distintos tratamientos con un rango de confianza del 95%.

$$w(i,j) = q \sqrt{\frac{CME}{2 (r_i + r_j)}}$$

Donde:

W= Tukey

W ij= comparador para el par de tratamientos i,j

q = Valor de la tabla de Tukey, con el número de tratamientos y grados de libertad del error

CME= Cuadrado medio del error

ri, rj son las repeticiones de los tratamientos i,j

4.8. Metodología experimental

4.8.1. Recolección de la materia prima

El material experimental como frutos y hojas de limón Real (*Citrus limonum*) se recolecto en la localidad del Embarcadero perteneciente al cantón Caluma, provincia de Bolívar- Ecuador. Se recolecto la materia prima seleccionándola cuidadosamente, usando guantes y con tijeras especiales para cortar el pedúnculo, y prestando especial atención con el fin de evitar pérdidas. Tanto el fruto como las hojas se revisaron que estén en óptimas condiciones, así como el color adecuado (limón pintón), de consistencia firme y sin signos de descomposición.

4.8.2. Preparación de muestras

- **Recepción de la materia prima**

La corteza y hojas de limón Real (*Citrus limonum*), después de su recolección fue transportada a través de recipientes metálicos a las instalaciones del laboratorio general de Laguacoto 1, perteneciente a la Universidad Estatal de Bolívar, lugar donde se desarrolló la investigación.

- **Selección**

Se seleccionaron limones que tengan un diámetro de 8,4 a 8,8 cm y las hojas con una longitud de 7 a 14,5 cm y un ancho de 4 a 8 cm.

- **Lavado**

Se procedió a lavar y desinfectar la materia prima recolectada con 5 ml de hipoclorito sódico en 10 lt de agua, para eliminar agentes extraños y otros tipos de microorganismos.

- **Secado**

En esta etapa se procedió a secar las matrices de estudio con paños absorbentes reutilizables.

- **Troceado**

Para el troceado de la corteza de limón Real se utilizó un rayador de cocina y para las hojas se utilizó unas tijeras de acero inoxidable, obteniendo pequeñas partículas y así conseguir un mejor rendimiento en el producto final.

4.9. Métodos de extracción

4.9.1. Extracción por el método de arrastre de vapor

Para la extracción de aceite esencial de la corteza y hojas de limón Real se utilizó un equipo de arrastre de vapor el que consta de las siguientes partes: Manta de calentamiento, un balón de 1.000 mL, cabeza de destilación adaptado con termómetro, refrigerante de bolas, codo de destilación, embudo de decantación y para sostener las estructuras se utilizan soportes universales. Según (Delgado,2019) realizó la extracción a la siguiente condicione:

- Se pesó 350 g de corteza y hojas de limón Real en una balanza analítica, luego se procedió a llenar en el balón de destilación con 400 mL de agua destilada. Dejando en reposo la materia prima por 16 horas a temperatura ambiente.

- Se realizó el montaje del equipo, encendiendo la manta de calentamiento manteniéndose durante el proceso de extracción a una temperatura de entre: 87 a 92 °C, durante un tiempo de 7 horas.
- Durante el tiempo que duro la extracción se fue recolectando el aceite esencial junto con el agua destilada evaporada, el cual se separó mediante el embudo de decantación.
- El aceite esencial se recolecto en un envase de vidrio color ámbar y almacenado a temperatura ambiente.

4.9.2. Extracción por el método de destilación fraccionada

Para la obtención del aceite esencial de la corteza y hojas de limón Real se utilizó un equipo de destilación Fraccionada el mismo que consta de las siguientes partes: Manta de calentamiento, un balón de 1.000 mL, columna de fraccionamiento, cabeza de destilación adaptado con termómetro, refrigerante de bolas, codo de destilación, embudo de decantación y para sostener todas las estructuras se utiliza un soporte universal.

- Para extraer el aceite esencial se utilizó 350 g de corteza y hojas de limón Real pesándolo en una balanza analítica, luego se procedió a llenar en el balón de destilación con 400 mL de agua destilada. Dejando en reposo la materia prima por 16 horas a temperatura ambiente.
- Luego del montaje del equipo se encendió la manta de calentamiento. Durante todo el proceso de extracción se mantuvo a una temperatura de: 87 a 90 °C, durante un tiempo de 7 horas.
- El aceite esencial se recolecto junto con el agua destilada evaporada, que posteriormente se separó mediante el embudo de decantación.

- El aceite esencial obtenido se recolecto en envases de vidrio color ámbar y almacenado a temperatura ambiente.

4.10. Rendimiento del aceite esencial

Una vez obtenido el aceite esencial tanto de la corteza como de las hojas del limón Real (*Citrus limonum*) por los dos métodos de extracción: Destilación por arrastre de vapor y destilación fraccionada, se procedió a realizar el cálculo de rendimiento aplicando la siguiente ecuación descrita por Melo et al, (2020).

$$P = (M_1 \setminus M_2) * 100$$

Donde:

M_1 = Es la masa final del aceite esencial

M_2 = La masa inicial del follaje

100 = Es un factor matemático

Para determinar el mejor rendimiento de las extracciones se aplicó la prueba de Tukey.

4.11. Determinación de la actividad antimicrobiana y antioxidante

4.11.1. Determinación de la Actividad antimicrobiana

4.11.1.1. Obtención de aislados bacterianos

Se trabajó con cepas previamente caracterizadas de *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* y *Arcobacter*, extraídas de queso, carne, suelo y agua. Las mismas que se encontraban encapsuladas en el Banco Microbiano del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Investigación y Vinculación perteneciente a la Universidad Estatal de Bolívar, estas se encontraban congeladas y fueron reanimadas para su posterior estudio.

Se preparó 4 cajas Petri para reanimar a las 4 bacterias antes mencionadas y para realizar el análisis de actividad antimicrobiana se preparó 48 cajas Petri con agar Muller Hinton para las tres cepas de cada bacteria y dos réplicas de la misma.

4.11.1.2. Preparación de medios (agares)

Se prepararon los medios para las distintas cepas bacterianas de acuerdo a las especificaciones del fabricante, utilizando así para *E. coli* sp el agar nutriente, para *Salmonella* sp. agar XLD, *Listeria* spp. agar (Aloa Listeria agar base + Blood Agar Base Infusión Agar) y finalmente para *Arcobacter* sp. (Arcobacter broth + Bacto agar+ sangre de cordero), la cual se disolvió en 100 mL de agua destilada para posteriormente llevar a hervir por un minuto en una plancha de calentamiento con agitación constante, posteriormente se esterilizó mediante autoclave a 121 °C por 15 minutos.

4.11.1.3. Reanimación bacteriana

- **Reanimado de aislados de *Escherichia coli* sp.**

Se trabajó con 3 aislados de *E. coli* sp, obtenidos de muestras de carne de cerdo. El proceso se llevó a cabo vertiendo 0,5 mL de cultivo (criovial), en cajas con agar nutriente (7145A, Acumedia, USA) e incubadas a 37 °C por un tiempo de 48 horas en condiciones de aerobiosis.

- **Reanimación de aislados de *Salmonella* sp**

Se seleccionaron 3 aislados de *Salmonella* sp, obtenidos de muestras de suelo. En las que se vertió 0,5 mL de cultivo (criovial), en cajas con agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato) (7166A, Acumedia, USA) estas fueron incubadas a 37 °C por un tiempo de 24 horas en condiciones de aerobiosis.

- **Reanimación de aislados de *Listeria* sp**

Se separó 3 aislados de *Listeria* spp, obtenidos de muestras de carne (pollo) y agua (Hospital y Colegio). El reanimado se llevó a cabo preparando cajas con Agar (Aloa Listeria agar base + Blood Agar Base Infusión Agar) (TM1443, TM media, India + 211037, BD,

Francia), en las mismas que se vertió 0.5 mL de cultivo (criovial), estas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas en condiciones de aerobiosis.

- **Reanimación de aislados de *Arcobacter sp***

Se trabajó con 3 aislados de *Arcobacter ssp*, obtenidos de muestras de quesos. El reanimado se llevó a cabo preparando cajas con agar sangre (Arcobacter broth + Bacto agar+ sangre de cordero) (CM0965, Oxoid, Inglaterra + 214010, BD, Francia) en las mismas que se vertió 0,5 mL de cultivo (criovial), estas fueron incubadas a 37 °C por un tiempo de 48 horas en condiciones de microerofilia (10% CO₂, 5% O₂, y 85% N₂).

4.11.1.4. Preparación de las muestras de Aceite esencial para la actividad antimicrobiana

Se colocó 1 mL de cada uno de los aceites esenciales obtenidos en los tubos eppendorf, en los cuales con la ayuda de una pinza previamente esterilizada se introdujo 12 discos en blanco PQ/50 de 6 mm por cada extracto, seguidamente se dejó en reposo durante 10 minutos.

4.11.1.5. Análisis de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales empleando el método Kirby Bauer (difusión disco-placa).

- Se efectuó una suspensión con solución salina al 10% hasta una turbidez de 0,5 en la escala McFarland, para disminuir la carga bacteriana de las cepas reanimadas.
- Con un hisopo previamente esterilizado, se procedió a realizar la siembra en placas de Müller Hinton Agar (225250, BD, Francia) de forma uniforme, con el apoyo de una pinza estéril, se fue colocando sobre la superficie del agar los discos en blanco que se encontraban sumergidos en el aceite esencial. Así también, se probó como control discos de Ciprofloxacina y Estreptomicina.

- Posteriormente, las placas se incubaron a condiciones aeróbicas a excepción de *Arcobacter* que se incubo a condiciones de microerofilia a una temperatura de 37 °C, durante un tiempo de 24 y 48 horas según corresponda.
- Posteriormente se midieron los diámetros de halos de inhibición de los discos. Los resultados obtenidos se demostraron según a los criterios señalados por el Instituto de Normas y Laboratorio Clínico (CLSI).

4.11.2. Determinación de la actividad antioxidante

4.11.2.1. Determinación de antioxidantes por el método de blanqueo con β -caroteno “bleaching (BCB) test”, descrito por Kulisic et al (2004).

- La solución de H₂O₂ (40mM) fue preparado en una solución de Hidróxido de sodio monobásico de fosfato de potasio (50 mmol; pH 7,4)
- La concentración del H₂O₂ fue determinado mediante absorción a 230nm en un Espectrofotómetro visible GENESYS™ 10S (Thermo Electron Corporation, 335902, USA)
- Subsecuentemente los aceites fueron adicionados de forma individual en concentraciones de 50 μ g/mL y 100 μ g/mL en H₂O₂, la absorbancia fue determinada a 230nm después de 10 min frente a las soluciones en blanco que contenían buffer, fosfato con H₂O₂.
- Posteriormente se calcula el % de barrido del peróxido de hidrogeno con la siguiente formula:

$$\text{Capacidad antioxidante (\% de H}_2\text{O}_2 \text{ secuestrado)} = \left(\frac{A_i - A_t}{A_i}\right) \times 100$$

Donde:

A_i= Absorbancia del estándar de referencia

A_t= Absorbancia de la muestra

4.12. Determinación por Cromatografía de gases (GC-MSD).

Los compuestos volátiles del extracto de hojas de limón Real obtenido por destilación fraccionada se realizaron en un Cromatógrafo de gases, acoplado a espectrometría de masas.

Para la preparación de la muestra se colocó en un inserto 80 μL de muestra y 160 μL de hexano, la cual se agito en un vortex por 2 min. Para la identificación de compuestos se efectuó en un cromatógrafo de fase gaseosa combinado con un detector de masas. Se utilizó una columna HP-5MS (30 m \times 0,25 mm \times μm) y helio 5,0 como gas portador.

Se empleó helio con un flujo de 0,8 mL /minuto, se inyectó 0,1 μL de muestra en modo splitless, la T de inyección concurre de 250 $^{\circ}\text{C}$, la T del horno ocurrió de: 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto aumentó a 126 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 6 $^{\circ}\text{C}$ /minuto posteriormente la temperatura sube a 165 $^{\circ}\text{C}$ a razón de 1,5 $^{\circ}\text{C}$ /minuto, finalmente se incrementó a 290 $^{\circ}\text{C}$ por una rampa de 8 $^{\circ}\text{C}$ /minuto y se mantuvo durante 6 minutos con la temperatura final. La T del detector de masas concurre de 260 $^{\circ}\text{C}$ en modo full scan de 40-450 AMU. Los compuestos se identificaron utilizando la librería NIST 14.L.

CAPÍTULO V

5. Resultados y discusión

5.1. Resultados del aceite esencial obtenido por cada método de extracción

5.1.1. Extracción por arrastre de vapor

Tabla 13. Resultados de la extracción del aceite esencial de limón Real (*Citrus limonum*).

Materia prima	Rep	Peso (g)	Solvente H ₂ O (mL)	T. extracción (h)	T°C	V. extraído (mL)	Promedio (mL)
Corteza	R1	350	400	7	87- 92	2,2	2,15
	R2	350	400	7		2,1	
Hojas	R1	350	400	7		0,9	0,85
	R2	350	400	7		0,8	

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 13, se muestran los resultados obtenidos de aceite esencial tras realizar 7 horas de extracción a una temperatura de 87- 92 °C, en la que se obtuvo 2,15 mL de aceite esencial de la corteza, mientras que en el aceite esencial de las hojas se extrajo 0,85 mL. Se puede evidenciar que el aceite esencial de la corteza se obtuvo en mayor volumen, esto debido a que la corteza posee vesículas oleaginosas (ojuelos), donde se alojan la mayor cantidad de aceite esencial, a diferencia en las hojas que tiene una textura lisa.

En la investigación realizada por Delgado (2019), de 500 g de cáscara de limón (*Citrus latifolia*) se extrajo 1 mL de aceite esencial, mientras que Chirinos & Quispe (2018), en su trabajo obtuvo un volumen de 6 mL de aceite esencial extraído de 3.303 g de cáscara y pulpa de limón sutil, dichos valores son inferiores a los obtenidos en la presente investigación, pudiendo atribuirse a la variedad del limón y a las condiciones con las que se trabajó.

Medrano (2019), en su investigación obtuvo 2 mL de aceite esencial de 850 g de hojas frescas de limón, por otro lado Ortega (2018), informa en su investigación un resultado de 0,48 mL de aceite esencial de limón persa trabajando con 50 g de hojas, se

puede apreciar que estos valores son superiores a las de nuestra investigación pudiendo considerar al método de preparación de la muestra y las condiciones de temperatura con las que se trabajó.

5.1.2. Extracción por destilación fraccionada

Tabla 14. Resultados de la extracción del aceite esencial de limón Real (*Citrus limonum*).

Materia prima	Rep	Peso (g)	Solvente H ₂ O (mL)	T. extracción (h)	T°C	V. extraído (mL)	Promedio (mL)
Corteza	R1	350	400	7	87-90	1,8	1,9
	R2	350	400	7		2	
Hojas	R1	350	400	7		0,7	0,65
	R2	350	400	7		0,6	

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 14, se muestran los resultados obtenidos de la extracción de aceite esencial por el método de destilación fraccionada en la que la temperatura oscila entre 87 - 90 °C durante 7 horas, dando como resultado el mayor volumen de 1,9 mL que corresponde a la corteza del limón Real, mientras que en las hojas del limón Real el volumen fue de 0,65 mL. Se puede evidenciar que el aceite esencial de la corteza es extraída en mayor cantidad a la de las hojas, por efecto a que esta posee ojuelos donde se encuentra mayor cantidad de aceite esencial.

Con respecto a la extracción del aceite esencial por el método de destilación fraccionada en corteza y hojas de limón no se encontraron referencias bibliográficas, por tal motivo, la presente investigación es la primera en realizar este tipo de extracción por el método mencionado.

5.2. Resultados del rendimiento del aceite esencial

A continuación, se reportan los resultados del rendimiento obtenido del aceite esencial de la corteza y hojas del limón Real por cada método de extracción.

5.2.1. Método por arrastre de vapor

Tabla 15. Resultados del rendimiento del aceite esencial por el método de arrastre de vapor.

Variables	Corteza	Hojas
Peso de muestra (g)	700	700
Peso de aceite esencial (g)	4,3	1,7
% Rendimiento	0,61	0,24

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 15, se muestra el porcentaje del rendimiento del aceite esencial extraída por arrastre de vapor con dos repeticiones, tanto de la corteza como de las hojas de limón Real, donde se identifica el rendimiento de 0,61% perteneciente a la corteza, mientras que el rendimiento de las hojas es de 0,24%. Se evidencia que el aceite de las hojas posee un rendimiento más bajo en comparación al rendimiento del aceite de la corteza. Pudiendo atribuirse a que las hojas al ser más delgadas almacenan baja cantidad de aceite esencial.

El rendimiento del aceite esencial de la corteza en nuestra investigación es superior a los informados por Cordova & Velasquez (2021), en la que informa un rendimiento de 0,5% de aceite esencial de corteza de limon (*Citrus x Limon*), de igual manera Laso & Jimeno (2018), en su investigación obtuvieron un rendimiento de 0,31% obtenido de *citrus limon*, un valor inferior a los que se obtuvo en la presente investigación. Mientras que el rendimiento en aceite esencial de hojas en nuestra investigación es inferior al que informa Ortega (2018), en donde obtiene un rendimiento de 0,95% en hojas de limón persa (*Citrus latifolia Tanaka*), del mismo modo Medrano (2019), evidencia un rendimiento de aceite esencial de 0,23% en el limón (*Citrus aurantifolia*), valor cercano al de nuestro trabajo. En tal sentido estos valores varían significativamente ya sea por la variedad del limón o por la zona de cultivo.

5.2.2. Metodo por destilacion fraccionada

Tabla 16. Resultados del rendimiento del aceite esencial por el método de destilación fraccionada

Variabes	Corteza	Hojas
Peso de muestra (g)	700	700
Peso de aceite esencial (g)	3,8	1,3
% Rendimiento	0,54	0,18

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 16, se observa los resultados del porcentaje del rendimiento del aceite esencial extraída por destilación fraccionada con dos repeticiones, tanto de la corteza como de las hojas de limón Real, donde se muestra el rendimiento de 0,54% corresponde a la corteza, a diferencia del rendimiento de las hojas que es de 0,18%. Se evidencia que el aceite de la corteza posee un rendimiento más alto en comparación al rendimiento del aceite de las hojas. Pudiendo atribuirse a que la corteza tiene ojuelos que almacenan aceite esencial en mayor cantidad, a diferencia de las hojas por ser delgadas y lisas contienen aceites esenciales en bajas cantidades. Con respecto a la extracción de aceite esencial del limón, tanto de la corteza como de las hojas por el método de destilación fraccionada no se encontraron referencias bibliográficas, en consecuencia, nuestro trabajo es el primero en realizarse.

Tabla 17. Análisis de varianza del rendimiento

Fuente	Gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor- ρ
Efectos principales					
A:Materia prima	1	0,262813	0,262813	333,73	0,0001
B:Método de extracción	1	0,0091125	0,0091125	11,57	0,0272
Interacciones					
AB	1	0,0001125	0,0001125	0,14	0,7247
Residuos	4	0,00315	0,0007875		
Total (corregido)	7	0,275187			

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 17, se observa el análisis de varianza del rendimiento del aceite esencial obtenido tanto de la corteza como las hojas, en el que los valores- p prueban la diferencia estadística de cada factor. Dado que 2 valores- p son inferiores que 0,05, entonces, el factor A (materia prima) y el factor B (métodos de extracción) resulta estadísticamente significativo en el rendimiento porcentual al 95,0% de confianza.

En la siguiente tabla se aplicó pruebas de comparación de medias de Tukey con un 95% de confianza, donde se evidencia el nivel de incidencia entre los factores A (materia prima) y B (métodos de extracción).

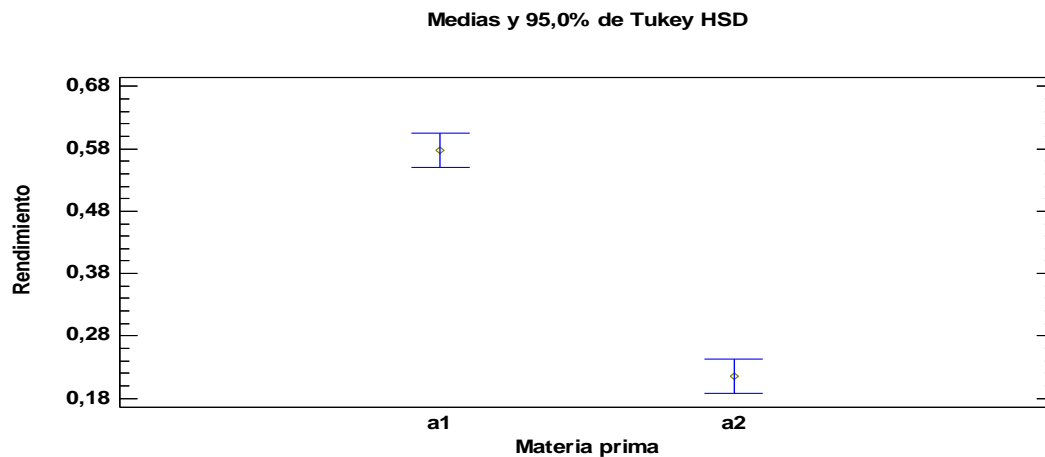
Tabla 18. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para el factor A en el rendimiento.

Materia prima	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
a2	4	0,2150	0,0140	B
a1	4	0,5775	0,0140	A

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 18, se demuestra la diferencia que existe entre los grupos homogéneos, ya que la media más alta corresponde al nivel a1 con un rendimiento de 0,5775%, es decir que el aceite esencial obtenido de la corteza del limón Real se extrae en mayor rendimiento (Figura 9).

Figura 9. Relación del Factor A (materia prima) con el rendimiento.



Fuente: Experimentales (2022).

En la figura 9, muestra que el nivel a1 se diferencia del nivel a2, dado a que estadísticamente con un 95% de confianza el aceite esencial de la corteza de limón Real presenta mayor rendimiento.

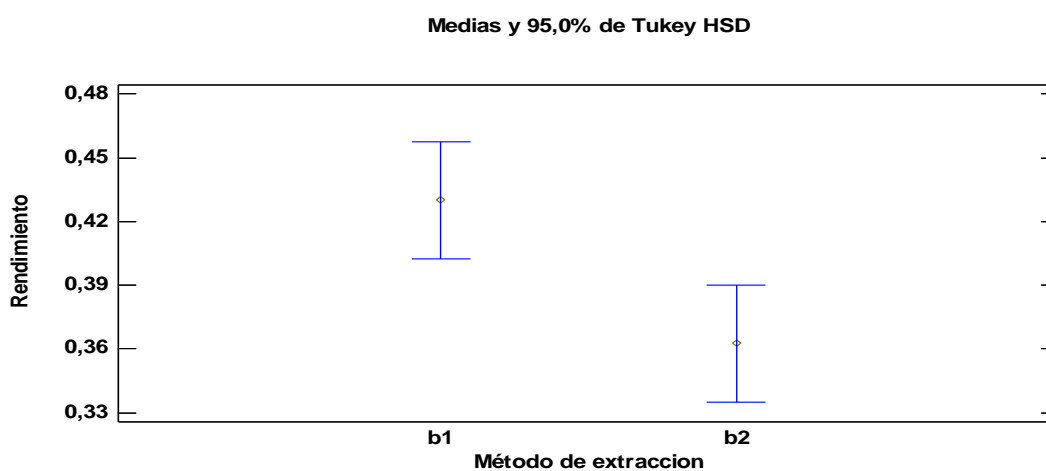
Tabla 19. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para el factor B en el rendimiento.

Método de extracción	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
b2	4	0,3625	0,0140	B
b1	4	0,4300	0,0140	A

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 19, se observa que el nivel b1 posee una media de rendimiento más alto con 0,4300%, a diferencia que el nivel b2 tiene un rendimiento de 0,3625%, por ende, el mejor método para extraer aceite esencial de limón Real es por arrastre de vapor (Figura 10).

Figura 10. Relación del Factor B (métodos de extracción) con el rendimiento.



Fuente: Experimentales (2022).

En la figura 10, muestra con un 95% de confianza que el aceite esencial obtenido por el método de destilación por arrastre de vapor (b1) presenta mayor rendimiento a diferencia del método de destilación fraccionada (b2).

5.3. Determinación de la actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial

5.3.1. Resultados de la capacidad de actividad antimicrobiana

Los Resultados que se presentan a continuación del Análisis de actividad antimicrobiana fueron trabajados con 3 aislados de cepas previamente caracterizadas de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria* y *Arcobacter*.

5.3.1.1. Análisis de actividad antimicrobiana de los aceites frente a *Escherichia coli* sp.

Tabla 20, Resultados de los diámetros (mm) de halos de inhibición de la capacidad antimicrobiana de aceites obtenidos frente a *Escherichia coli*.

Cepas de <i>E. coli</i>	Tratamientos				Antibióticos de control	
	T1	T2	T3	T4	Ciprofloxacina	Estreptomina
Cer 60	1	1	3,5	1	25	29
Cer 62	1	1	1	8,5	27	31
Cer 61	1	1	9	7	25	29

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 20, se evidencia los resultados de los halos de inhibición de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón Real tanto de la corteza como de las hojas por los dos métodos de extracción frente a las cepas de *E. coli*, donde se observa que el T3 para la cepa Cer 61 presenta un halo de inhibición de 9 mm de diámetro, así mismo el T4 para a cepa Cer 62 tiene un halo de inhibición de 8,5 mm, seguido de la cepa Cer 61 con un diámetro de 7 mm del mismo tratamiento, siendo estos valores más representativos para la actividad antimicrobiana frente a las cepas de *E. coli*.

En los antibióticos de control usados como la ciprofloxacina y la estreptomina los halos de inhibición son muy superiores a los halos obtenidos del aceite esencial de limón Real frente a las cepas de *E.coli*, por lo tanto dichos aceites presentan baja actividad antimicrobiana.

En el estudio de Vignola et al, (2020), revelaron que en el extracto de limón (*Citrus lemon*) obtenido por arrastre de vapor, para la actividad antimicrobiana frente a la bacteria *E. coli*, obtuvieron un halo de inhibición de 9,66 mm de diámetro, denominándole así como moderada actividad antimicrobiana, dicho valor concuerda con los valores de nuestra investigación en el T3 y T4 frente a las cepas Cer 61 y Cer 62 respectivamente, mientras que Espinel (2020), informa un halo de inhibición de 1.5 mm de diámetro en el extracto de limón (*C. lantifolia*) obtenida por arrastre de vapor frente a la bacteria *E. coli*, valor igual a los tratamientos T1 y T2 de nuestra investigación que representan baja actividad antimicrobiana.

Por otro lado, Montero (2009), en su investigación menciona que no existe actividad antimicrobiana en el extracto de limón (*C. lantifolia*), extraída por hidrodestilación frente a la bacteria de *E. coli*. Los datos logrados en nuestro estudio difieren significativamente a los de otros investigadores, posiblemente debido a la variedad de limones y métodos de extracción.

Tabla 21. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para la capacidad de actividad antimicrobiana contra *E. coli*.

Cepas de <i>E.Coli</i>	Materia prima	Media LS	Grupos homogéneos	Métodos de extracción	Media LS	Grupos homogéneos
Cer 60	a2	2,25	C	b1	2,25	C
Cer 62	a2	4,75	B	b2	4,75	B
Cer 61	a2	8,00	A	b1	5,00	A

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 21, se evidencia la prueba de Tukey de la actividad antimicrobiana contra las cepas de *E. coli*, donde se observa que el factor A (materia prima) los grupos homogéneos son diferentes dado que la media más alta corresponde al nivel a2 con un valor de 8,00 mm de halo de inhibición, es decir, que el aceite esencial extraído de las hojas de limón Real

presenta mayor actividad antimicrobiana frente a la cepa Cer 61 de *E. coli*. Mientras que para el factor B (métodos de extracción) la media más alta corresponde al nivel b1 con un halo de inhibición de 5,00 mm de diámetro, por ende, el método por arrastre de vapor presenta mayor acción antimicrobiana frente a la cepa de *E. coli*, Cer 61.

5.3.1.2. Análisis de actividad antimicrobiana de los aceites frente a *Salmonella* sp.

Tabla 22. Resultados de los diámetros (mm) de halos de inhibición de la capacidad antimicrobiana de aceites obtenidos frente a *Salmonella*.

Cepas de <i>Salmonella</i>	Tratamientos				Antibióticos de control	
	T1	T2	T3	T4	Ciprofloxacina	Estreptomina
Suelo 58	1	1	3	5	21,5	18
S7	1	1	6	6,5	24	16
SM3	1	2	8	7	23,75	19

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 22, se observa los resultados de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón Real así como de la corteza y hojas por los dos métodos de extracción, frente a las cepas de *Salmonella*, en la que el T3 y T4 posee mayor efecto antimicrobiano, en la que se destaca la cepa SM3 con un halo de inhibición de 8 mm de diámetro, seguido de la cepa S7 con halos de inhibición de 6 y 6,5 mm de diámetro respectivamente, de igual manera los antibióticos de control usado como la ciprofloxacina posee un halo de inhibición de entre 21,5-24 mm de diámetro, mientras que la estreptomina tiene un halo de inhibición de entre 16 -19 mm de diámetro, por lo tanto el aceite esencial de limón Real posee baja actividad antimicrobiana ya que los halos de inhibición de los antibióticos tanto de la ciprofloxacina como de la estreptomina son superiores sobre las cepas de *Salmonella*. Es muy importante destacar que conforme Ponce, (2008), para que exista un efecto inhibitorio de aceites y extractos naturales el tamaño de halo deberá ser de un mínimo de 8 mm, de tal

forma que se puede considerar que los aceites si presentan un afecto inhibitorio claro frente al género *Salmonella*.

En el trabajo realizado por Jiménez et al, (2013), en el extracto de lima dulce obtenido por maceración, dieron a conocer un halo de inhibición de 30 mm de diámetro frente a la bacteria *Salmonella*, un valor muy diferente a la de nuestra investigación, en otro estudio realizado por Blas & Fernandez (2021), obtuvieron un resultado de 6 mm de diámetro de halo de inhibición de aceite esencial de *citrus sinensis* sobre la bacteria de *Salmonella*, dato idéntico a las de nuestro trabajo en el T3 y T4 en la cepa S7, es decir que no presenta actividad antimicrobiana a diferencia del T3 y T4 en la cepa SM3 supera los 6 mm de diámetro por lo tanto dichos tratamientos si presentan actividad antimicrobiana, Torres (2018), en su investigación realizada en el aceite esencial de naranja da a conocer un halo de inhibición de 16 mm de diámetro, valor idéntico al antibiótico de control ciprofloxacina en la cepa S7 y superior a los halos de inhibición del aceite esencial de nuestra investigación.

Con relación a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón por los dos métodos de extracción no se encontraron reportes en la literatura de tal manera que se realizó comparaciones con frutos cítricos, por lo tanto, nuestro trabajo de investigación es la primera en realizarse.

Tabla 23. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para la capacidad de actividad antimicrobiana contra *Salmonella*.

Cepas de <i>Salmonella</i>	Materia prima	Media LS	Grupos homogéneos	Métodos de extracción	Media LS	Grupos homogéneos
S8	a2	4,00	C	b2	3,00	C
S7	a2	6,25	B	b2	3,75	B
SM3	a2	7,5	A	b2	4,5	A

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 23, se muestra la prueba de Tukey de la actividad antimicrobiana contra las cepas de *Salmonella*, donde se evidencia que en el factor A (materia prima) los grupos homogéneos son diferentes dado que la media más alta corresponde al nivel a2 con un valor de 7,5 mm de halo de inhibición, entonces el aceite esencial obtenido de las hojas de limón Real presenta mayor actividad antimicrobiana frente a la cepa SM3 de *Salmonella*. Mientras que en el factor B (métodos de extracción), la media más alta pertenece al nivel b2 con un halo de inhibición de 4,5 mm de diámetro, por ende, el método de destilación fraccionada presenta mayor acción antimicrobiana frente a la cepa SM3.

5.3.1.3. Análisis de actividad antimicrobiana de los aceites frente a *Listeria sp.*

Tabla 24. Resultados de los diámetros (mm) de halos de inhibición de la capacidad antimicrobiana de aceites obtenidos frente a *Listeria sp.*

Cepas de <i>Listeria</i>	Tratamientos				Antibióticos de control	
	T1	T2	T3	T4	Ciprofloxacina	Estreptomina
L.28	1	1	34,5	31	38,75	30,25
PTI	2,5	5	39,5	40	33,75	27,75
L.36	1	1	25	25	36,5	32,75

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 24, se evidencia los resultados acción antimicrobiana de los aceites esenciales tanto de la corteza como de la hoja por los dos métodos de extracciones frente a las cepas de *Listeria*, donde se observa que las tres cepas en los tratamientos T3 y T4 superan el rango de los halos de inhibición del antibiótico de control tanto de la ciprofloxacina y estreptomina, demostrando así que existe actividad antimicrobiana en dichos tratamientos, mientras que los tratamientos T1 y T2 poseen baja actividad antimicrobiana ya que los halos de inhibición es muy inferior a los de antibióticos de control usado. Además, los valores de diámetro de halo están sobre los 8 mm recomendados por Ponce (2008).

Tinoco (2020), realizó un estudio donde demuestra un halo de inhibición de 8,7 mm de diámetro en el extracto de limón (*Citrus latifolia*), un valor distinto a la de nuestra investigación, Torres (2018), en su investigación presenta un valor de 12 mm de diámetro de halos de inhibición en el aceite esencial de naranja sobre la bacteria *Listeria*, valor que es menor a los T3 y T4 de nuestro trabajo presentando baja actividad antimicrobiana, finalmente Córdova et al, (2020), demostraron un halo de inhibición de 18,2 mm de diámetro en el aceite esencial de naranja obtenido por el método de extracción por microondas donde informa que a escala de inhibición ≥ 20 mm es fuertemente inhibitoria; es moderada/medianamente inhibitoria cuando tiene un área $<20-12$ mm; y < 12 mm no es inhibitoria, por lo tanto, los valores de la presente investigación en el T3 y T4 presenta fuerte actividad antimicrobiana con valores de 25 a 40 mm de diámetro.

Tabla 25. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para la capacidad de actividad antimicrobiana contra *Listeria*.

Cepas de <i>Listeria</i>	Materia prima	Media LS	Grupos homogéneos	Métodos de extracción	Media LS	Grupos homogéneos
L.28	a2	32,75	B	b1	17,35	B
PTI	a2	39,75	A	b2	22,5	A
L.36	a2	25	C	b2	13	C

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 25, se detalla la prueba de Tukey con un 95% de confianza para la actividad antimicrobiana contra *Listeria*, donde se evidencia que los grupos homogéneos en el factor A (materia prima), son diferentes, dado que la media más alta pertenece al nivel a2 con un valor de 39,75 mm de halo de inhibición, es decir el aceite esencial de las hojas de limón Real muestra mayor actividad antimicrobiana frente a la cepa PTI de *Listeria*. En el caso del factor B (métodos de extracción) se tiene a la media más alta el nivel b2 con un halo de inhibición de 22,5 mm, por ende, el método de destilación fraccionada presenta mayor acción antimicrobiana frente a la cepa de *Listeria* PTI.

5.3.1.4. Análisis de actividad antimicrobiana de los aceites frente a *Arcobacter sp.*

Tabla 26. Resultados de los diámetros (mm) de halos de inhibición de la capacidad antimicrobiana de aceites obtenidos frente a *Arcobacter sp.*

Cepas de <i>Arcobacter</i>	Tratamientos				Antibióticos de control	
	T1	T2	T3	T4	Ciprofloxacina	Estreptomina
Q3NC2	1	1	27,5	15,5	24,75	15,5
Q1NC1	30	5	32	40	44	33
Q18BC1	34	19,5	46	46	41,75	28

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 26, se observa los resultados de la actividad antimicrobiana del aceite esencial obtenido de limón Real tanto de la corteza como de las hojas por los dos métodos de extracción, en donde la cepa Q3NC2 en los T1 y T2 tienen baja actividad antimicrobiana mientras que el tratamiento T3 y T4 posee un halo de inhibición de 27,5 y 15,5 mm de diámetro respectivamente. De igual manera, a aceptación de la cepa Q1NC1 en el T2, los halos de inhibición de los aceites esenciales se encuentran entre el rango de los halos de la ciprofloxacina y estreptomina antibióticos de control que se usó en esta investigación, por lo tanto, existe actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Arcobacter*. Del mismo modo, nuestros resultados son alentadores, dado a que Ponce et al, (2008), considera que un grado de susceptibilidad aceptable de un microorganismo a agentes de origen vegetal debe ser de un mínimo de 8 mm.

Según Vidal (2017), en su trabajo de investigación determina los puntos de corte de la ciprofloxacina sobre *Arcobacter*, donde menciona que es resistente cuando el halo de inhibición es \leq a 20 mm de diámetro y susceptible cuando el halo de inhibición es \geq a 24 mm de diámetro, por lo tanto, los valores de nuestra investigación poseen actividad antimicrobiana en los aceites esenciales de limón Real frente a *Arcobacter* ya que sus valores están entre 27,5 a 46 mm de diámetro, Vasconez (2019), da a conocer un valor promedio de

31,9 mm de diámetro de halo de inhibición del antibiótico estreptomina frente a *Arcobacter*, valor similar a la de nuestra investigación a excepción en la cepa Q3NC2 que tiene un valor de 15,5 mm de diámetro, según las recomendaciones dadas por la CLSI (2017), para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión disco-placa utilizando la ciprofloxacina frente a *Arcobacter*, informa que es resistente cuando el halo de inhibición es \leq a 12 mm de diámetro y susceptible cuando es \geq a 24 mm de diámetro, es decir los valores obtenidos en nuestro trabajo presentan actividad antimicrobiana. Con respecto a la actividad antimicrobiana al aceite esencial de limón Real frente a la bacteria *Arcobacter* no se encontró información en la literatura, por lo tanto, la presente investigación es la primera en realizarse de tal manera que la interpretación se realizó haciendo comparación a los halos de inhibición de los antibióticos de control.

Tabla 27. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para la capacidad de actividad antimicrobiana contra *Arcobacter*.

Cepas de <i>Arcobacter</i>	Materia prima	Media LS	Grupos homogéneos	Métodos de extracción	Media LS	Grupos homogéneos
Q3NC2	a2	21,5	C	b1	14,25	C
Q1NC1	a2	36	B	b1	31	B
Q18BC1	a2	46	A	b1	40	A

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 27, se observa la prueba de Tukey con un 95% de confianza para la capacidad de actividad antimicrobiana contra *Arcobacter*, donde se evidencia que los grupos homogéneos en el factor A (materia prima) y el factor B (métodos de extracción), son diferentes, dado que la media más alta en el factor A pertenece al nivel a2 con un valor de 46 mm de halo de inhibición, por otro lado en el factor B la media más alta pertenece al nivel b1 con un halo de inhibición de 40 mm, de esta manera se puede comprobar que el aceite esencial obtenido con las hojas del limón Real mediante el método de destilación por

arrastre de vapor presenta mayor actividad antimicrobiana frente a la cepa de Q18BC1 de *Arcobacter*.

5.3.2. Resultados de la capacidad de actividad antioxidante

5.3.2.1. Análisis de antioxidantes por el método de blanqueo con β -caroteno “bleaching (BCB) test”, descrito por Kulisic et al (2004).

A continuación se presentan los análisis de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales por el método de blanqueo con β -caroteno “bleaching (BCB) test”, descrito por Kulisic et al (2004), en donde se describe la concentración de antioxidantes del aceite esencial obtenido de la corteza y hojas de limón Real por los dos métodos de extracción.

Tabla 28. Resultados de la capacidad antioxidante (% de peróxido secuestrado) de los aceites obtenidos.

Tratamiento	% de peróxido secuestrado	
	Concentración (mg/mL)	
	50	100
T1	25,58	16,31
T2	26,08	47,29
T3	9,19	30,00
T4	48,82	36,04

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 28, se muestra los resultados de la actividad antioxidante de aceite esencial de limón Real tanto, de la corteza y de las hojas por los dos métodos de extracción, en la que se realizó a una concentración de 50 y 100 mg/mL, donde se evidencia que el tratamiento T4 en la concentración de 50 mg/mL tiene 48,82% de peróxido secuestrado cantidad más elevada con respecto a los demás tratamientos, de igual manera en el T2 a una concentración de 100 mg/mL posee un porcentaje de 47,29 de peróxido secuestrado del mismo modo un valor más representativo con los demás tratamientos.

En la investigación realizada por Del Toro et al, (2015), dan a conocer un resultado de 30,39 EC₅₀ (mg/mL) en el aceite esencial de limón por el método inhibición de la decoloración del β-caroteno, mientras que Miranda (2017), por el mismo método obtuvo un valor de 4,03 EC₅₀ (mg/mL) pero en aceite esencial de mandarina de la variedad *basol*, las cantidades informados por los autores difieren significativamente con las de nuestro trabajo, pudiendo atribuir a la variedad del cítrico, al método de obtención de aceite esencial, al estado de maduración, lugar de donde se cosechó y las condiciones climáticas. Por otro lado, Alvaréz et al, (2015), realizaron una investigación de la actividad antioxidante por el método DPPH donde obtuvieron un resultado de 1,05 CI₅₀ mg/mL en aceite esencial de limón *citrus latifolia* extraída por maceración.

Tabla 29. Análisis de varianza de la capacidad de actividad antioxidante de los aceites obtenidos a una concentración de 50 mg/mL.

Fuente	Gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos Principales					
A:Materia prima	1	20,0345	20,0345	2,55	0,1855
B:Método de extracción	1	805,61	805,61	102,56	0,0005
Interacciones					
AB	1	765,187	765,187	97,41	0,0006
Residuos	4	31,4197	7,85492		
Total (corregido)	7	1622,25			

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 29, se expresa el análisis de varianza de la capacidad de actividad antioxidante del aceite esencial obtenido de la corteza y hojas de limón Real a una concentración de 50 mg/mL, en el que los valores- ρ demuestran la diferencia estadística de cada factor. Puesto que 2 valores- ρ son inferiores que 0,05, donde, el factor B (métodos de extracción) es estadísticamente significativo sobre % de peróxido secuestrado con un 95,0% de confianza.

En la tabla 30, se aplicó pruebas de Tukey con un 95% de confianza para determinar la efectividad del factor A (materia prima) en la capacidad antioxidante.

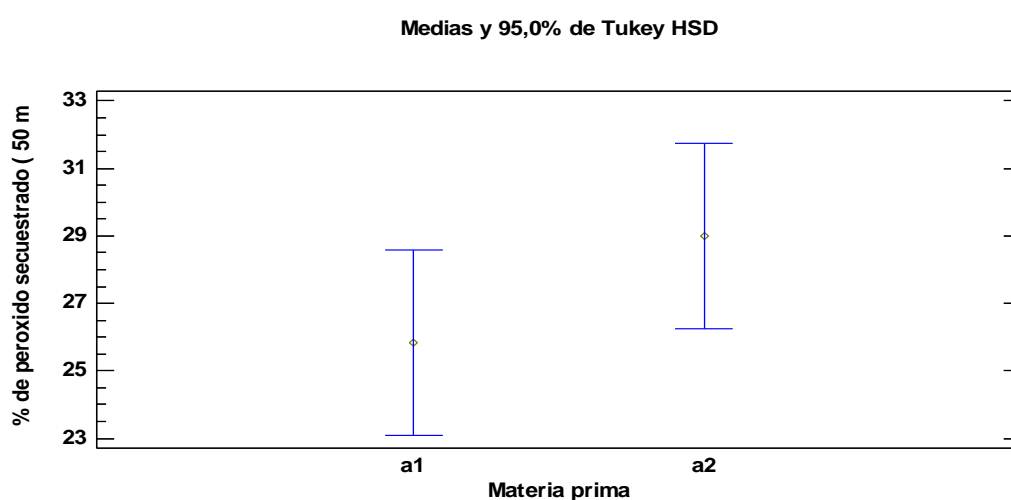
Tabla 30. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para el factor A en la capacidad de actividad antioxidante.

Materia prima	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
a1	4	25,8350	1,4013	B
a2	4	29,0000	1,4013	A

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 30, se puede observar la diferencia que hay entre los grupos homogéneos, ya que la media más alta corresponde al nivel a2 con una actividad antioxidante de 29,0000%, es decir que el aceite esencial obtenido de las hojas del limón Real presenta mayor concentración de antioxidantes, ya que el aceite esencial de las hojas posee compuestos como Citronellol y Citronellal como se puede observar en la figura 15 del cromatograma, en los picos 18 y 25 con un área superior a 5% (Figura 11).

Figura 11. Relación del Factor A (materia prima) con la capacidad de acción antioxidante.



Fuente: Experimentales (2022).

En la figura 11, se prueba que el nivel a2 es distinto del nivel a1, es decir q estadísticamente con un 95% de confianza el nivel a2 presenta mayor actividad antioxidante.

En la tabla 31, se aplicó pruebas de Tukey con un 95% de confianza para identificar el nivel de efectividad del factor B (métodos de extracción), dentro de la actividad antioxidante.

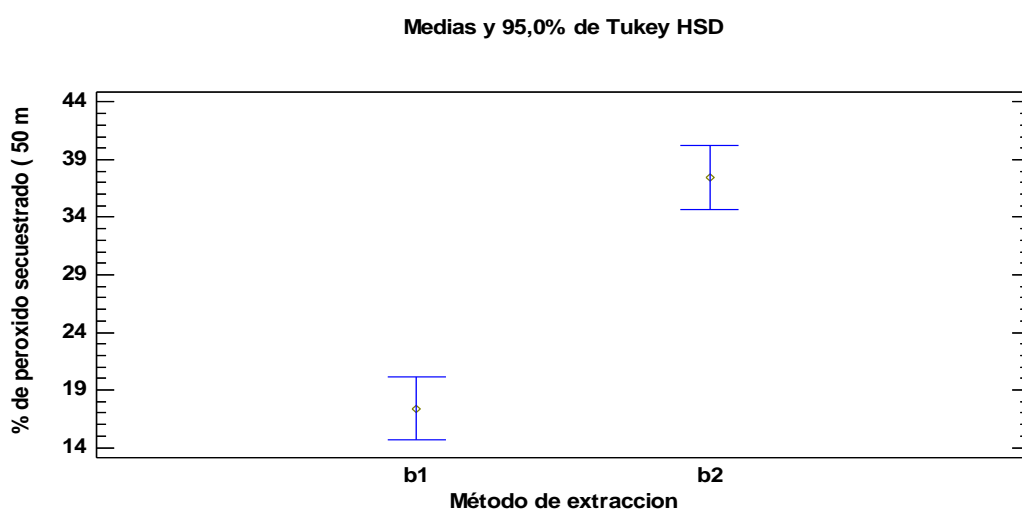
Tabla 31. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para el factor B en la capacidad de actividad antioxidante.

Método de extracción	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
b1	4	17,3825	1,4013	B
b2	4	37,4525	1,4013	A

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 31, se muestra que hay diferencia entre los grupos homogéneos, dado que la media más alta pertenece al nivel b2 con una actividad antioxidante de 37,4525%, es decir que el aceite esencial obtenido por el método de destilación fraccionada presenta mayor concentración de antioxidantes debido a que este método permite extraer el aceite esencial en bajas cantidades, pero de mayor pureza (Figura 12).

Figura 12. Relación del Factor B (métodos de extracción) con la capacidad de actividad antioxidante



Fuente: Experimentales (2022).

En la figura 12, se observa que el nivel b2 y el nivel b1 son diferentes, es decir q estadísticamente con un 95% de confianza el aceite esencial obtenido por el método de destilación fraccionada presenta mayor actividad antioxidante.

Tabla 32. Análisis de varianza de la capacidad de actividad antioxidante de los aceites obtenidos a una concentración de 100 mg/mL.

Fuente	Gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A:Materia prima	1	2,98901	2,98901	0,04	0,8489
B:Método de extracción	1	685,425	685,425	9,47	0,0370
Interacciones					
AB	1	311,127	311,127	4,30	0,1068
Residuos	4	289,475	72,3688		
Total (corregido)	7	1289,02			

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 32, se presenta el análisis de varianza de la capacidad de actividad antioxidante del aceite esencial a una concentración de 100 mg/mL, aquí los valores-p presentan diferencia estadística en cada factor. Dado que un valor- ρ es inferior a 0,05, el cual corresponde al factor B (métodos de extracción) que posee un efecto estadísticamente significativo sobre% de peróxido secuestrado con un nivel de confianza del 95,0%.

En la tabla 33, se aplicó pruebas de Tukey con un 95% de confianza para determinar el alcance del efecto en el factor B (métodos de extracción) en la capacidad antioxidante.

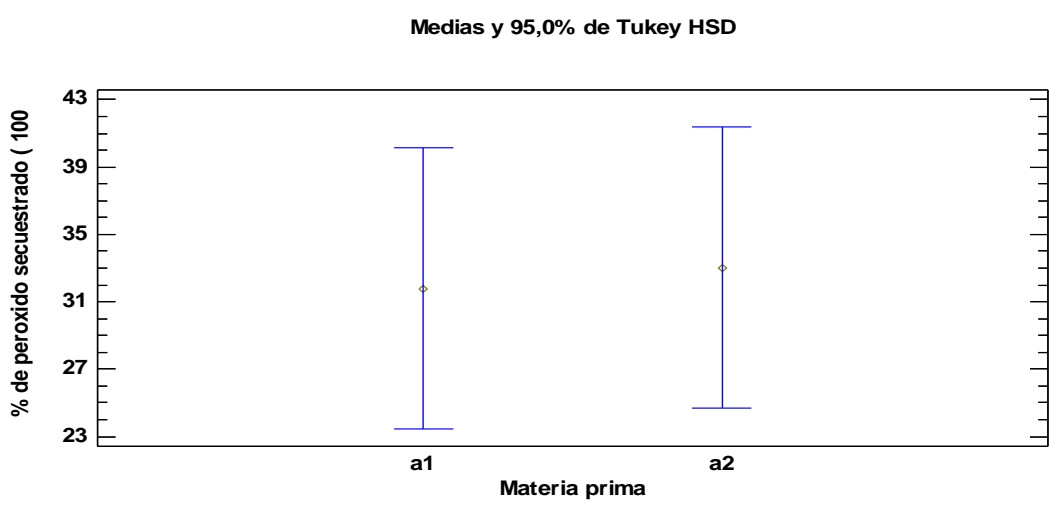
Tabla 33. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para el factor A en la capacidad de actividad antioxidante.

Materia prima	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
a1	4	31,7975	4,2534	B
a2	4	33,0200	4,2534	A

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 33, se manifiesta que hay diferencia significativa en los grupos homogéneos, donde, la media más alta corresponde al nivel a2 con un 33,0200% de actividad antioxidante, es decir que el aceite esencial obtenido de las hojas del limón Real presenta mayor concentración de antioxidantes, ya que poseen compuestos como Citronellol y Citronellal como se puede observar en el cromatograma de la figura 15, dichos compuestos se le atribuye propiedades antioxidantes (Figura 13).

Figura 13. Relación del Factor A (materia prima) con la capacidad de actividad antioxidante.



Fuente: Experimentales (2022).

En la figura 13, muestra que el nivel a2 se diferencia del nivel a1, es decir q estadísticamente con un 95% de confianza el aceite esencial de las hojas de limón Real presenta mayor actividad antioxidante.

En la tabla 34, se aplicó pruebas de Tukey con un 95% de confianza, determinando así el nivel de eficacia del factor B (métodos de extracción), en la capacidad antioxidante.

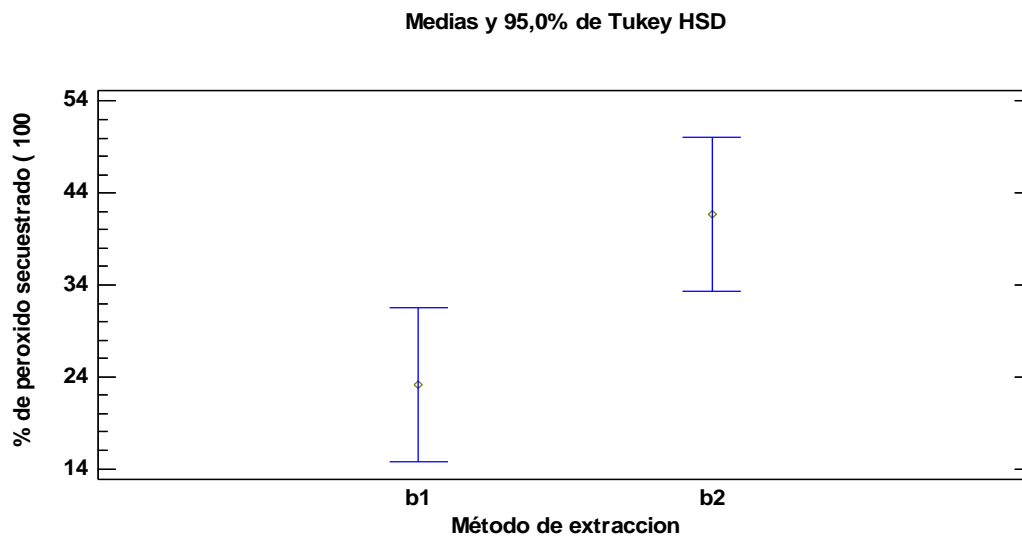
Tabla 34. Prueba de Tukey con un 95% de confianza para el factor A en la capacidad de actividad antioxidante.

Método de extracción	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
b1	4	23,1525	4,2534	B
b2	4	41,6650	4,2534	A

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 34, la diferencia entre los grupos homogéneos son evidentes, en el cual la media más alta pertenece al nivel b2 con una actividad antioxidante de 41,6650%, es decir que el aceite esencial obtenido por el método de destilación fraccionada presenta mayor concentración de antioxidantes ya que en dicho método el aceite esencial presenta mayor pureza sin contaminación del solvente (Figura 14).

Figura 14. *Relación del Factor B (métodos de extracción) con la capacidad de actividad antioxidante*



Fuente: Experimentales (2022).

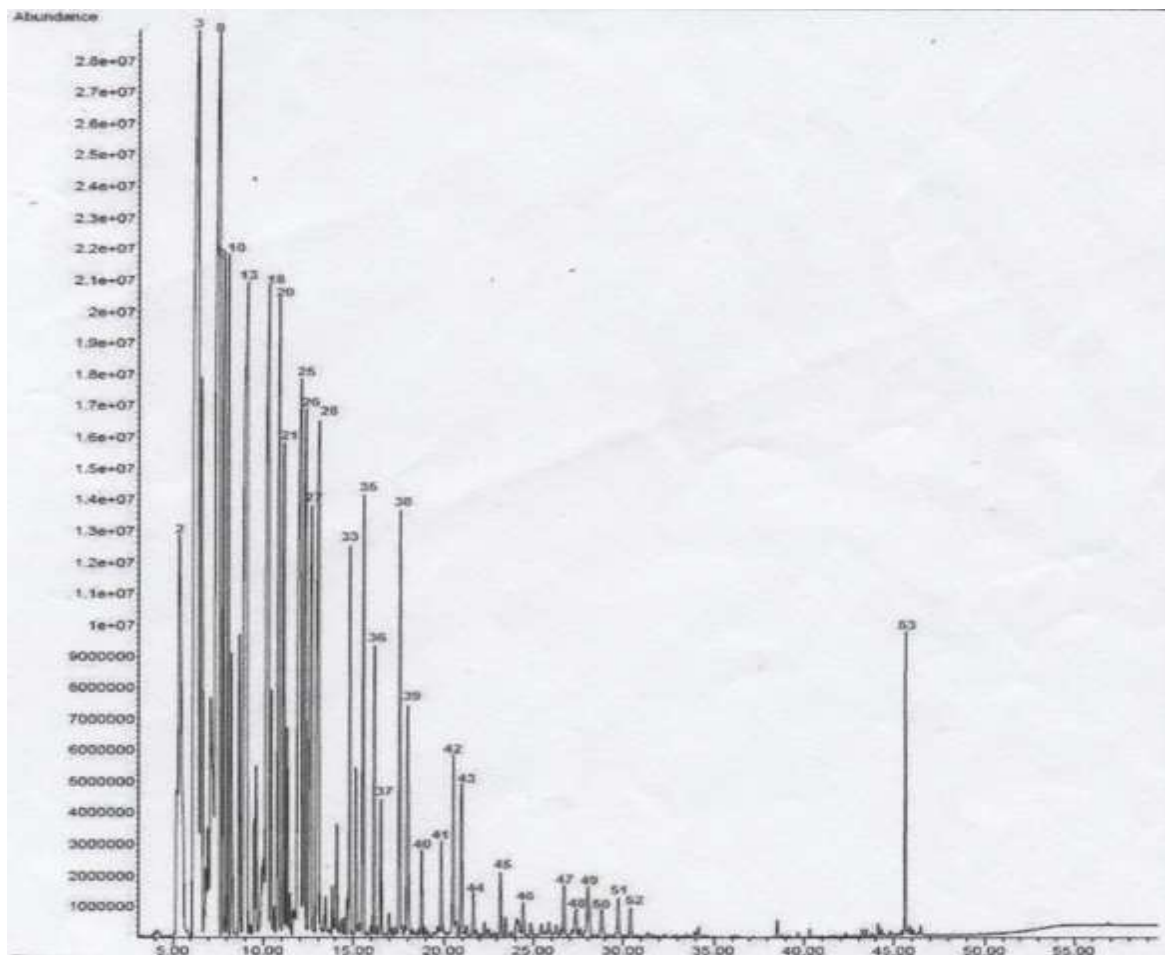
En la figura 14, muestra que el nivel b2 es diferente del nivel b1, es decir q estadísticamente con un 95% de confianza el aceite esencial obtenido por el método de destilación fraccionada presenta mayor actividad antioxidante.

5.4. Resultados de los compuestos volátiles por cromatografía de gases del aceite esencial obtenido

A continuación, se muestra la identificación de compuestos volátiles del aceite esencial obtenido de hojas de limón Real por el método de destilación fraccionada (a2b2), el mismo que en la presente investigación se destacó por ser el mejor tratamiento ante la actividad antimicrobiana y actividad antioxidante.

En la figura 15. Se observa la identificación de compuestos volátiles en el cromatograma donde se identificó un total de 53 picos cromatógrafos, sin embargo, pocos tienen mayor intensidad.

Figura 15. Cromatograma del aceite esencial de las hojas de limón Real por destilación fraccionada.



Fuente: Experimentales (2022).

En la figura 15. Se observa el cromatograma del aceite esencial de las hojas de limón Real extraído por destilación fraccionada, en el mismo que se identifican un total de 53 picos cromatográficos, registrando al pico número 3 con una mayor intensidad y con un tiempo de retención de 6,356 min, con un tiempo de retención de 9,104 min el pico número 13, con un tiempo de retención de 7,551 min el pico número 8, seguido del pico número 25 con un tiempo de retención de 12,047 min, el pico número 2 con un tiempo de retención de 5,335min, por último con un tiempo de retención de 10,282min el pico 18, los mismos que poseen abundancia media.

En la siguiente tabla se especifica los compuestos volátiles registrados con mayor área en el aceite esencial de hojas de limón Real por destilación fraccionada.

Tabla 35. *Compuestos volátiles del aceite esencial de hojas de limón Real por destilación fraccionada.*

N.º	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Área (%)
1	β -Thujene	5,218	0,89
2	1R- α -Pinene	5,335	4,18
3	Sabinene	6,356	14,21
4	β -Myrcene	6,525	3,74
5	γ -Limonene	6,805	0,34
6	3-Carene	6,926	0,50
7	Terpinolene	7,064	2,46
8	D-Limonene	7,551	12,09
9	β -Ocimene	7,821	3,54
10	γ -Terpinene	8,061	2,39
11	trans-Sabinene hydrate	8,219	1,06
12	α -Terpinolene	8,675	1,16
13	Linalool	9,104	7,68
14	cis-2-p-Menthen-1-ol	9,490	0,34
15	4-trans,6-cis-Allocimene	9,596	0,61
16	6-Octenal, 7-methyl-3-methylene-	9,952	0,47
17	Isopulegol	10,028	0,31
18	Citronellal	10,292	5,98

19	Isoneral	10,437	0,66
20	Terpinen-4-ol	10,874	3,88
21	α -Terpineol	11,131	1,68
22	cis-p-Menth-1-en-3-ol	11,214	0,13
23	Teresantalol	11,296	0,75
24	trans-Piperitol	11,454	0,15
25	Citronellol	12,074	6,35
26	β -Citral	12,331	3,33
27	Geraniol	12,655	2,93
28	α -Citral	13,061	4,07
29	p-Mentha-1(7),8(10)-dien-9-ol	13,461	0,09
30	Undecanal	13,826	0,11
31	p-Vinyl guaicol	14,073	0,29
32	8-Hydroxyneomenthol	14,658	0,11
33	δ -Elemene	14,801	1,26
34	Citronellol acetate	15,144	0,49
35	cis-Geranyl acetate	15,563	2,00
36	Geranyl acetate	16,160	1,04
37	(-)- β -Elemene	16,531	0,45
38	Caryophyllene	17,586	2,00
39	γ -Elemene	17,997	1,30
40	Humulene	18,788	0,31
41	Germacrene D	19,874	0,34
42	β -Cyclogermacrane	20,537	0,70
43	β -Bisabolene	20,994	0,84
44	Cadina-1(10),4-diene	21,644	0,17
45	Germacrene B	23,173	0,29
46	Caryophyllene oxide	24,416	0,15
47	Isospathulenol	26,687	0,28
48	τ -Cadinol	27,351	0,19
49	α -Cadinol	28,013	0,42
50	Isolongifolol	28,778	0,18
51	α -Bisabolol	29,712	0,21
52	2,6,11-Dodecatrienal, 2,6-dimethyl - 10-methylene-	30,392	0,15
53	Phytol	45,618	0,76

Fuente: Experimentales (2022).

En la tabla 35, se observa los compuestos identificados en el aceite esencial de las hojas de limón Real (*Citrus limonum*), por destilación fraccionada, donde se señala a los compuestos con mayor área, mencionando a Sabinene con un área de 14,21% que corresponde al pico más alto en el cromograma, seguido de D-Limonene con un área de 12,09% los mismos que fueron identificados por Ponce (2017), en el aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*), a las que atribuye propiedades de acción antimicrobiana; también se encontró en nuestra investigación a Linalool con un área de 7,68%, el mismo que lo identificó Argote et al, (2017), en el aceite esencial de mandarina, dicho compuesto es ampliamente estudiado por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas. Becerra & Castro (2019), en su investigación identificaron los compuestos Citronellal, Geraniol, Citronellol, y β -Citral, en las plantas Limonaria y Citronela, donde menciona que estos compuestos poseen un potencial antimicrobiano y antioxidante, los mismos compuestos fueron identificados en el aceite esencial de limón Real destacándose el compuesto Citronellol con un área de 6,35% y Citronellal con un área de 5,98%, y finalmente tenemos a 1R- α -Pinene con un área de 4,18%, identificado también por Ponce (2017), en el aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*), a las que atribuye propiedades de acción antimicrobiana. Mahdian et al, (2017), identificó el compuesto Caryophyllene en el aceite esencial de *Echinophora platyloba*, este compuesto también se encontró en el presente trabajo con un área de 2,00% y en el tiempo de retención de 17,586 min el cual actúa como antimicrobiano y antioxidante.

CAPÍTULO VI

6. Comprobación de hipótesis

Las hipótesis planteadas en el presente estudio son:

6.1. Hipótesis nula (H_0)

En las propiedades bioactivas, los tratamientos no presentan diferencia estadística significativa.

6.2. Hipótesis alterna (H_1)

En las propiedades bioactivas, los tratamientos presentan diferencia estadística significativa.

6.3. Verificación de la hipótesis para las propiedades bioactivas

Según los datos obtenidos de la actividad antimicrobiana, al realizar el análisis de varianza se demostró que existe diferencia significativa entre el factor A (materia prima) y factor B (métodos de extracción) ya que los valores son inferiores al 0,05, de igual manera para la actividad antioxidante si existe diferencia significativa solo para el factor B (métodos de extracción), por consiguiente, se acepta la hipótesis alterna y se rechaza la hipótesis nula.

CAPITULO VII

7. Conclusiones y recomendaciones.

7.1. Conclusiones

- Se tuvo aceite esencial tanto de la corteza como de las hojas de Limón Real (*citrus limonum*) extraídas por el método de arrastre de vapor y destilación fraccionada, donde se extrajo mayor volumen del aceite a partir de la corteza mediante arrastre de vapor con un valor medio de 2,15 mL.
- El cálculo estadístico para el rendimiento del aceite esencial obtenido demostró un mayor valor en la corteza que en las hojas de limón Real, tanto por arrastre de vapor con 0,61% como por destilación fraccionada con 0,54%.
- En el análisis de la actividad antimicrobiana de los aceites obtenidos frente a bacterias patógenas como: *E coli*, *Salmonella*, *Listeria* y *Arcobacter*, demostró que existe mayor actividad en el aceite esencial de hojas de limón Real (*citrus limonum*) por destilación fraccionada frente a *Listeria* con un halo de inhibición de 40 mm de diámetro, de igual manera existe también mayor actividad antimicrobiana en el aceite esencial de hojas de limón Real (*citrus limonum*), por arrastre de vapor y destilación fraccionada frente a la bacteria *Arcobacter*, el mismo que tiene un halo de inhibición de 46 mm de diámetro, esto dado a que los halos de inhibición del aceite esencial son similares a los halos de inhibición del antibiótico de control utilizados, mientras que para las bacterias *E coli* y *Salmonella* existe baja actividad antimicrobiana.
- El análisis de la actividad antioxidante demostró que el aceite esencial de hojas de limón Real (*citrus limonum*) por destilación fraccionada a una concentración de 50 mg/ mL tiene mayor concentración de antioxidante con un valor de 48,82% de peróxido secuestrado.

- La respuesta experimental fue; el aceite esencial con mejores propiedades bioactivas (actividad antioxidante y efecto antimicrobiano), donde el aceite obtenido de hojas de limón Real mediante destilación fraccionada fueron el mejor.
- La caracterización cromatográfica del mejor aceite esencial identificó 53 picos cromatográficos, donde el compuesto de mayor intensidad fue el Sabinene, con un área de 14,21% en un tiempo de retención de 6,356 min, seguido de D-Limonene con un área de 12,09 con un tiempo de retención de 7,551 a los cuales se les atribuye propiedades antimicrobianas.

7.2. Recomendaciones

- Para obtener mayor rendimiento en aceites esenciales es recomendable trabajar con limones de color pintón o verdes, ya que si está demasiado maduro el rendimiento del aceite esencial es deficiente.
- Estudiar otros métodos de extracción con este material experimental ya que existe escasa información y verificar si el rendimiento difiere significativamente con la de nuestra investigación.
- Recolectar los aceites esenciales en envases de color ámbar y cubrirlos con papel aluminio para que no tengan contacto directo con la luz y no se destruyan sus propiedades bioactivas.
- Realizar estudios de actividad antimicrobiana y antioxidante en diferentes variedades de limones del cantón Caluma, emplear otro método para la determinación de antioxidantes y para la acción antimicrobiana utilizar otras bacterias gran positivas.
- Identificar los compuestos volátiles de diferentes variedades de limones del cantón Caluma, por cromatografía líquida y cromatografía de masas ya que los cítricos aportan una actividad antioxidante y antimicrobiana.
- Controlar la temperatura de extracción con un termómetro infrarrojo para mayor exactitud de datos ya que a cambios de temperatura se destruyen sus compuestos volátiles.
- Realizar la curva de calibración para la actividad antioxidante en un espectrofotómetro NANODROP.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, A., & Del Castillo, C. (2020). Boro total en hojas de limon Tahiti (Citrus x latifolia) en finca Aleman Martinez por el método azometina-H empleando espectroscopia UV/VIS, LABSA-UNA, julio-diciembre 2019. *Repositorio Institucional UNAM-Managua*, 26. Obtenido de <https://repositorio.unan.edu.ni/id/eprint/14084>
- Alejos , I. (2018). Aislamiento y caracterización molecular de cepas de Escherichia coli y Salmonella spp. En 6 ambientes acuaticos de la bahía de Sechura, Piura. *Tesis-Posgrado*. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima- Perú. Obtenido de https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/3793/Aislamiento_AlejosTapia_Ines.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Alemán , Z., Díaz, R., & Fonseca, J. (2015). Aislamiento y Detección de Listeria monocytogenes en Queso Fresco Artesanal que se Expende en el Mercado Iván Montenegro de la Ciudad de Managua Noviembre-Diciembre 2014. *Tesis- pregrado*. Universidad Nacional de Autonoma de Nicaragua, Managua, Managua. Obtenido de <https://repositorio.unan.edu.ni/1023/1/63723.pdf>
- Álvares , G., & Cueva , J. (2020). Efecto de diferentes tipos de hidrocoloides en el tiempo de estabilidad de una bebida refrescante de limón (citrus limon) con panela. *Repositorio digital dentro de información bibliotecario de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabi Manuel Felix Lopez*. Obtenido de <https://repositorio.espam.edu.ec/handle/42000/1284>
- Álvarez , D., Garza, G., & Vázquez, R. (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Antimicrobianos*. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v32n5/art02.pdf>
- Alvaréz , N., López, A., & Marroquín, S. (2015). Formulación de una loción a partir de (Citrus latifolia) limón persa, (Citrus aurantifolia) limón criollo, (Apium graveolens) apio y (Petroselinum crispum) perejil, como sustitutos de la esencia de Bergamota (Citrus bergamia) utilizada en el Hospital. *Tesis Pregrado*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Obtenido de http://www.repositorio.usac.edu.gt/975/1/06_3712.pdf

Amores, C., & Hernández, P. (2018). Activos antioxidantes en la formulación de productos cosméticos anti envejecimiento. *Ars Pharmaceutica*.

doi:<http://dx.doi.org/10.30827/ars.v59i2.7218>

Anguisaca, E. (2019). Extracción de seis aceites esenciales: “hierba luisa, limón Meyer, menta piperita, flor de naranjo, Pelargonium graveolens y tomillo” por arrastre de vapor y su aplicación en la gastronomía. *Repositorio Universidad de Cuenca*.
Obtenido de

<https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/32199/1/Trabajo%20de%20titulaci%C3%B3n.pdf>

Argote, F., Suarez, J., Tobar, M., Perez, J., Hurtado, A., & Delgado, J. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en Staphylococcus aureus y Escherichia coli. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 52-60.
doi:[doi://dx.doi.org/10.18684/bsaa\(v15\)EdiciónEspecialn2.578](http://dx.doi.org/10.18684/bsaa(v15)EdiciónEspecialn2.578)

Becerra, M., & Castro, D. (2019). Extracción de aceites esenciales de las plantas Limonaria (Cymbopogon citratus) y Citronela (Cymbopogon nardus) provenientes de la Sabana de Bogotá como posibles antimicrobianos para uso en el sector agrícola. *ABA Bacteriología y laboratorio químico*. Obtenido de

<https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/291/Presentaci%C3%B3n%20sustentacion.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Blas, F., & Fernandez, T. (2021). Actividad antibacteriana del aceite esencial de cáscaras de Citrus sinensis (L.) Osbeck "naranja" frente a Salmonella typhimurium ATCC 14028 y pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, in vitro. *Tesis pregrado*. Universidad Maria Auxiliadora, Mima Perú. Obtenido de

<https://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12970/475/ACTIVIDAD%20ANTIBACTERIANA%20DEL%20ACEITE%20ESENCIAL%20DE%20C%81SCARAS%20DE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Butnariu, M., & Sarac, I. (2018). Essential Oils from Plants. *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*, 3. doi:<https://doi.org/10.1302/issn.2576-6694.jbbs-18-2489>

- Caballero, Y., & Rodriguez, M. (2019). Obtención de aceites esenciales a partir de cáscara de mango (*Mangifera indica* L.) mediante técnica de destilación por arrastre de vapor. *Tesis pregrado*. Universidad de San Buenaventura. Obtenido de <http://bibliotecavirtualoducal.uc.cl:8081/handle/10819/2599>
- Calderón , Y. (2017). Evaluación Socioeconómica de los Productores del Cultivo de Caña de Azúcar Orientado a la Elaboración de Bio-Etanol en el Cantón Caluma de la Provincia de Bolívar. *Repositorio UCE*. Obtenido de <https://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/10888/1/T-UCE-0005-102-2017.pdf>
- Cano, L. (2018). Prevalencia de *Arcobacter* spp en niños con diarrea y sin diarrea de la ciudad de Loja. *Tesis- Pregrado*. Univeridad técnica particular de Loja, Loja-Ecuador. Obtenido de <https://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/20.500.11962/22468/1/Beltr%C3%A1n%20Cano%2C%20Lilibeth%20Alejandra.pdf>
- Carvajal, L., & Vimos, K. (2017). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lasiocephalus ovatus* schldl. (Asteraceae) que crece en Ecuador, en el periodo Abril- Agosto 2017. *Tesista Pregrado*. Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba- Ecuador. Obtenido de <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/4160/1/UNACH-EC-FCS-LAB-CLIN-2017-0014.pdf>
- Chasipanta, E., & Chicaiza, T. (2016). Evaluación de la actividad antioxidante bioautográfica de 5 variedades de aceites esenciales amazónicos (*Ocotea quixos*; *Psidium guajava*; *Eugenia Stipitata*; *Piper auritum*; *Piper imperiale*). *Tesis pregrado*. Universidad Politecnica Salesiana Sede Quito, Quito Ecuador. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12141/1/UPS-QT09649.pdf>
- Chirinos , D., & Quispe , V. (2018). Estudio tecnico economico para la produccion de aceite esencial de limon sutil (*Citrus Aurantifolia*) utilizable en la idustria de perfumeria. *Tesis pregrado*. Universidad Nacional de Ingenieria, Lima. Obtenido de <http://cybertesis.uni.edu.pe/handle/uni/14158>

CLSI. (2017). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*.

Cordova, Y., & Velasquez, J. (2021). Cinética de extracción de aceite esencial por arrastre de vapor a escala piloto de la naranja, mandarina, lima y limón. *Tesis pregrado*. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Arequipa Perú. Obtenido de http://190.119.145.154/bitstream/handle/20.500.12773/12535/IQcohayl_vehujm.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Cordova, C., Guillén, J., & Tuesta, T. (2020). Extracción por microondas libre de solvente del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*), y el efecto de las condiciones de proceso en su rendimiento, composición y actividad antimicrobiana. *Revista Chilena de Nutrición*, 965-974. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182020000600965>

Cordova, Y., & Velasquez, J. (2021). Cinética de extracción de aceite esencial por arrastre de vapor a escala piloto de la naranja, mandarina, lima y limón. *Tesis Pregrado*. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Arequipa. Obtenido de http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12773/12535/IQcohayl_vehujm.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Del Toro, C., Pérez, V., Rodríguez, P., Córdova, J., & Lugo, E. (2015). Compuestos bioactivos de cítricos: extracción, caracterización y actividad antioxidante. *Alimentos funcionales y compuestos bioactivos*. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Norma-Flores-Martinez/publication/342601000_Aceites_esenciales_como_antioxidantes_y_antimicrobianos_naturales/links/5efcaecf92851c52d60cc7ee/Aceites-esenciales-como-antioxidantes-y-antimicrobianos-naturales.pdf#page=18

Delgado, (2018). Evaluación del rendimiento, calidad y actividad antioxidante del aceite esencial de cáscara de naranja fresca de la especie *Citrus maxima* (Burm) Merr. familia rutaceae, obtenida por dos métodos de extracción. *Repositorio Universidad Central del Ecuador*. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/385515750/Extraccion-de-aceite-esencial-de-naranja>

- Delgado, L. (2019). Evaluación in vitro de los aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis* L.) y limón (*Citrus latifolia*), frente a *Sclerotinia* sp., agente causal del moho blanco en lechuga. *Tesis de pregrado*. Universidad de Cundinamarca, Facatativa. Obtenido de <https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/bitstream/handle/20.500.12558/2675/EVALUACION%20in%20vitro%20DE%20LOS%20ACEITES%20ESENCIALES%20DE%20NARANJA%20%28Citrus%20sinensis%20L.%29%20Y%20LIMON%20%28Citrus%20lat.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Espinel, A. (2020). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tres especies de *Citrus* Limon contra *Echerichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *Tesis Pregrado*. Universidad Agraria del Ecuador, Milagro- Ecuador. Obtenido de <http://181.198.35.98/Archivos/ESPINEL%20OBREGOSO%20ANDREA%20JUDITH.pdf>
- Estrada, H., Restrepo, C., Saumett, H., & Pérez, L. (2018). Deshidratación osmótica y secado por aire caliente en Mango, guayaba y limón para la obtención de ingredientes funcionales. *Información tecnológica*. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642018000300197>
- Flores, A. (2018). “Efecto sinérgico del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Origanum vulgare* (orégano) sobre la actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*”. *Tesis pregrado*. Universidad Alas Peruanas, Lima Perú. Obtenido de https://repositorio.uap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12990/4931/Tesis_efectoSin%20a9rgico_aceite%20esencial_Tomillo.or%20a9gano_antimicrobiana_sobre%20ListeriaM._Salmonella%20E..pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Fuentes, P. (2019). Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases para la diferenciación de nueces (*Juglans Regia*) según su origen. *Tesis posgrado*. Universidad de Cádiz. Obtenido de https://rodin.uca.es/bitstream/handle/10498/22384/TFM_Fuentes_Pablo_2020.pdf?sequence=1

- Garavello , M., Beltran, V., & Kornowski, M. (2019). Catálogo de portainjertos cítricos. *Investigación de desarrollo e innovación* .
- Gutiérrez , L., & Tunqui, C. (2017). Evaluación de la calidad del destilado alcohólico de anís (*Pimpinella anisum* L.) obtenidos por destilación simple y fraccionada en una industria licorera. *Repositorio Institucional de la UNSA*. Obtenido de <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/5375>
- Herrera, P., Garcia, C., & Delgado, L. (2019). Eficacia disolvente y citotoxicidad del aceite de cascara de limon (*Citrus limon*). *Revista Estomatológica Herediana*. doi:<https://doi.org/10.20453/reh.v29i3.3603>
- Huanca , N. (2018). Efecto de la inclusión de hoja de limón y paja de arroz en la dieta de cabras lecheras sobre la caidad de la leche y las características del queso tronchón. *Tesis Pregrado*. Universitat Politècnica de València, Valenca. Obtenido de https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/115322/memoria_P116295100.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Huet, C. (2017). Determinación de antioxidantes en muestras biológicas. *Tesis pregrado*. Universidad Complutense. Obtenido de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/CRISTINA%20HUET%20BRE%C3%91A.pdf>
- Inga, K. (2017). Efecto de diferentes concentraciones de sapo Huasca (*Cissus verticillata*) en el enraizamiento de limón rugoso (*Citrus jambhiri* L.) Pucallpa- Ucayali. *Tesis de pregrado*. Iniversidad Nacional de Ucayali, Pucallpa- Perú.
- Jiménez, S., Villanueva, S., Serrano, G., & Garcia, M. (2013). Estudio de extractos de lima dulce (*citrus limeta risso*) sobre salmonella typhimurium ATCC 14028, Escherichia coli ATCC 8739 y Staphylococcus aureus ATCC 6538. *CIATEJ*. Obtenido de <http://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/272>
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 633-640.

- Laso, M., & Jimeno, N. (2018). Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor. *Ingenieros Agroindustriales*. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid. Obtenido de https://oa.upm.es/49669/1/TFG_IRENE_CASADO_VILLAVERDE.pdf
- Lin, P., Lee, J., & Chang, I. (2016). Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Journal of Food and Drug Analysis*,. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.12.006>
- Llamoca, M. (2017). Efecto de la aplicación de tres dosis proma T-lina en el proceso para la obtención de plántulas en *Citrus jambhiri* (limón rugoso) y *Citrus volkameriana* (limón volkameriano) aptos para la injertación de *Citrus aurantifolia* (limón sutil). *Tesis Pregrado*. Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes- Perú. Obtenido de <http://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12874/352/TESIS%20-%20LLAMOCA%20VERA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Luna, G., Viloria, D., Villegas, J., Salgado, M., & Dominguez, A. (2019). Drying and extraction process of lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *Agrociencia*. Obtenido de <https://www.agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/1795>
- Mahdian, F., Mahboubi, M., Rahimi, E., & Moslehi, M. (2017). Composición química y actividades antimicrobianas y antioxidantes del aceite esencial de *Echinophora platyloba*. *Department of Food Science and Technology*. doi:<http://dx.doi.org/10.22354/in.v21i3.675>
- Mamani, S. (2020). Síntesis verde y caracterización de nanopartículas de plata en matriz de arcilla chak'ó y su actividad antimicrobiana en *E. coli* Atcc 51813. *Tesis posgrado*. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco Perú. Obtenido de http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/5634/253T20201028_TC.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Medrano, M. (2019). Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (Limón Peruano) frente a *Staphylococcus aureus*. *Tesis Pregrado*. Universidad Católica los Ángeles Chimbote, Trujillo- Perú. Obtenido de http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/16381/EFEECTO_AU

REUS_MEDRANO_GASTANUADI_MILAGROS_DE_JESUS.pdf?sequence=1
&isAllowed=y

Melo, M., Ortiz, D., & Hurtado, Á. (2020). Comparación de la composición y de la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos y otras técnicas verdes. *Ciencias químicas*, 845-856. doi:con fluidos supercríticos y otras técnicas verdes

Miranda, L. (2017). Valoración nutricional, compuestos bioactivos y actividad antioxidante de cítricos: Clementinas y naranjas pigmentadas. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense, Madrid. Obtenido de

<https://eprints.ucm.es/id/eprint/45998/1/T39491.pdf>

Montero, M. (2016). Destilación simple y fraccionada como estrategia metodológica para fortalecer el aprendizaje de la separación de los componentes de una mezcla en los estudiantes de primer año de bachillerato del colegio Hernán Gallardo Moscoso de la ciudad de Loja period. *Tesis- Pregrado*. Universidad Nacional de Loja, Loja-Ecuador. Obtenido de

<https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/10859/1/TESIS%20Magdalena%20Elizabeth%20Montero%20Paccha.pdf>

Montero, Y. (2009). Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón persa (*Círus latífoia* Tanaka). *Tesis Pregrado*. Universidad Veracruzana. Obtenido de

<https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46805/MonteroCelisYanina.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

Mora, M., & Ramos, S. (2020). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de cebolla colorada (*Allium cepa*) frente a microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi*. *Tesis pregrado*. Universidad de Guayaquil, Guayaquil Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/49302/1/BCIEQ-T-0517%20Mora%20Quiroz%20Maoly%20Stephania%3b%20Ramos%20Castro%20Stefan%3%ada%20Yuricoth.pdf>

- Morales, A. (2020). Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y acuoso de la cáscara de plátano (*Musa paradisiaca* L.) frente a *Propionibacterium acnes* para su uso en la elaboración de un gel antiacné. *Tesis pregrado*. Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca, Cuenca- Ecuador. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18804/4/UPS-CT008782.pdf>
- Nestares, Z., & Panéz, L. (2019). Efectividad del uso del limón (citrus limón) en el tratamiento de escorbuto en niños de 6 - 10 años, del colegio particular integrado Francisco Bolognesi - Yanacancha - abril a julio del 2018. *Repositorio Institucional Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión*, 28. Obtenido de <https://repositorio.undac.edu.pe/handle/undac/1007>
- Ortega, J. (2018). Extracción y caracterización fisicoquímica del aceite esencial obtenido de las hojas y flavelo del fruto del limón persa (*sitrus latifolia tanaka*) cultivado en los departamentos de suchitepéquez, escuintla y santa rosa guatemala, a escala laboratorio. *Tesis Pregrado*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Obtenido de <http://www.repositorio.usac.edu.gt/10906/1/Gerson%20Jo%C3%A9%20Ortega%20Morales.pdf>
- Ponce, A., Roura, S., Del Valle, C., & Moreira, M. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. *Postharvest Biology and Technology*.
doi:doi:10.1016/j.postharvbio.2008.02.013
- Ponce, M. (2017). “Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi* L) y su incorporación en formulaciones farmacéuticas”. *Tesis Pregrado*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Obtenido de <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/QF1441.pdf>
- Rábago, A. (2017). Actividad Antibacteriana y Antioxidante de Tortillas de Maíz (*Zea mays* L.) Criollo Azul Obtenidas por el Proceso de Nixtamalización. *Tesis de pregrado*. Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán. Obtenido de

https://www.researchgate.net/profile/Angel-Rabago-Monzon/publication/349899713_Actividad_Antibacteriana_y_Antioxidantes_de_Tortillas_De_Maiz_Zea_mays_L_Criollo_Azul_Obtendidas_por_el_Proceso_de_Nixtamalizacion/links/6046a5d4a6fdcc9c782189c3/Actividad-Antib

Román Páez, M. A., Rivera Narváez, C. M., Cardona Bermúdez, L. M., Muñoz, L. M., Gómez, D. D., Passaro Carvalho, C., & Quiceno Rico, J. M. (2016). Guía de extracción por fluidos supercríticos: fundamentos y aplicaciones. *Sistema de Bibliotecas Repositorio Institucional SENA*, 9. Obtenido de <https://repositorio.sena.edu.co/handle/11404/4698>

Sáenz Pérez, C. A., Osorio Hernández, E., Estrada Drouaillet, B., Poot Poot, W. A., Delgado Martínez, R., & Rodríguez Herrera, R. (2019). Principales enfermedades de los cítricos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7. doi:<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1827>

Santistevan, M. (2016). La sustentabilidad del cultivo del Limón (*Citrus aurantifolia* (Christm) S.) en la provincia Santa Elena, Ecuador. *Tesis Doctorado*. Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima- Perú.

Scalvenzi, L., Guerrini, A., Yaguache, B., & Cabrera, P. (2016). Actividad Antifúngica invitro de aceites esenciales de *ocotea quixos* (lam) *kosterm* y *piper aduncum* L. *Scielo Bioagra*.

doi:https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612016000100005

Solano, H. (2018). *Cadena comercial de naranja (citrus sinensis L.) en el Cantón Ventanas, provincia de los Ríos*. Universidad de Guayaquil, Guayaquil. Obtenido de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/36382/1/Solano%20Robinzon%20Hugo%20Roberto.pdf>

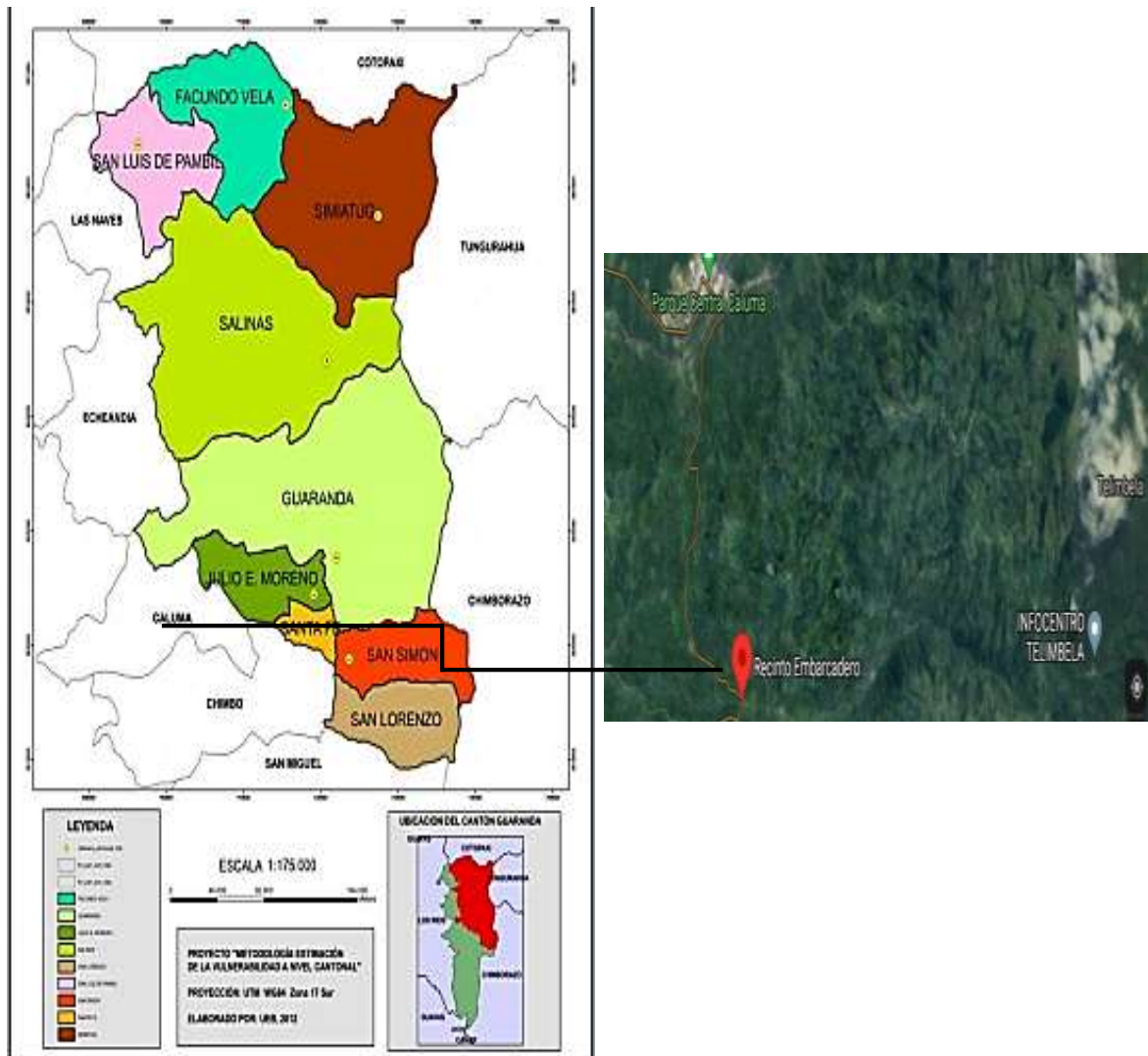
Suasnavas, J. (2017). Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de 4 géneros de microalgas originarias de la estación antártica ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado usando cepas ATCC. *Tesis pregrado*. Universidad Central del Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/12812/1/T-UCE-0008-BC005-2017.pdf>

- Talavera, M. (2018). Evaluación Sensorial y Estudio de la Vida Útil de Té Aromático Elaborado a Base de Llantén (*Plantago Major L*), Canela (*Cinnamomun Verum*) y Limon Sutil (*Citrus Aurantifolia Swingle*). *Repositorio Universidad Privada de Tacna*, 27. Obtenido de <https://repositorio.upt.edu.pe/handle/UPT/1068>
- Tinoco, D. (2020). Estudio de la extracción a alta presión de activos de piel de limon y su posible uso en la impregnación de CO2 supercrítico en la obtención de envases activos para su uso alimentario. *Tesis pregrado*. Universidad de Cadiz, Puerto Real Cádiz. Obtenido de <https://rodin.uca.es/bitstream/handle/10498/23514/TFG.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Torres , C. (2018). Microencapsulación de aceite esencial de naranja y sus concentrados mediante emulsiones e inclusión molecular para la estabilización y preservación de su actividad antimicrobiana y antioxidante. *Tesis Doctoral*. Universidad Autonoma de Nuevo León. Obtenido de <http://eprints.uanl.mx/16686/1/1080290318.pdf>
- Vásconez, F. (2019). Estudio de la actividad antimicrobiana de ciprofloxacina y estreptomycin en los géneros *Echerichia* y *Arcobacter* aislados de agua y alimentos de origen animal. *Tesis pregrado*. Universidad Estatal de Bolivar, Guaranda Ecuador. Obtenido de <https://dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/3395/1/TESIS%20FELIPE%20FINAL%2012.pdf>
- Vega, R. (2019). Actividad antimicrobiana de aceites esenciales obtenidos por dos métodos de extracción diferentes de tres especies vegetales medicinales peruanas frente a *streptococcus pneumoniae*". *Tesis de posgrado*. Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima.
- Veliz, W. (2015). Evaluación agronomica en fase de vivero de cuatro especies de porta injerto en citricos (*citrus sp*) en la estación experimental de sapecho - La Paz. *Tesis Pregrado*. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz- Bolivia. Obtenido de <https://repositorio.umsa.bo/xmlui/bitstream/handle/123456789/6764/T-2224.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Ventura, A. (2017). Comparación de tres métodos en la extracción de aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia ssp.*). *Tesis- Pregrado*. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas , Chachapoyas- Perú. Obtenido de <http://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/UNTRM/1192/informe%20de%20tesis-Eisten%20Ventura%20Grandez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Vidal, B. (2017). Comparación de la resistencia antibiótica y potencial patogénico en cepas de *Arcobacter butzleri* obtenidas de producción avícola Industrial y doméstica. *Tesis pregrado*. Universidad Austral de Chile, Valdivia Chile. Obtenido de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2017/fcv649c/doc/fcv649c.pdf>
- Vignola, M., Serra, M., & Andreatta, A. (2020). Actividad Antimicrobiana de Diversos Aceites Esenciales en Bacterias Benéficas, Patógenas y Alterantes de Alimentos. *Revista tecnología y ciencia*, 92-100. doi:<https://doi.org/10.33414/rtyc.37.92-100.2020>
- Zabaleta, C. (2021). Elaboración y propuesta validación de un método analítico para la determinación de límites de etilenglicol y dietilenglicol en sorbitol solución 70% por cromatografía de gases en la industrial farmacéutica Anglopharma S.A. *Tesis pregrado*. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá Colombia. Obtenido de <https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/26706/ZabaletaVanegasCamiloAndres.2021.Elaboraci%C3%B3n%20y%20propuesta%20de%20validaci%C3%B3n%20de%20un%20m%C3%A9todo%20anal%C3%ADtico%20para%20la%20determinaci%C3%B3n%20de%20l%C3%ADmites%20de%2>

ANEXOS

Anexo 1. Mapa de investigación.



Anexo 2. Resultados de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.

Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales contra las cepas de *Escherichia coli*.

Tratamiento	Rep	Código	Tiemp (h)	Cer 60			
				halo de inhibición (mm)			
				halo de inhibición (mm)	Ciprofloxacina	Estreptomicina	Promedio
T1	R1	a1b1	48	1	25	29	1
	R2	a1b1	48	1	25	29	
T2	R1	a1b2	48	1	25	29	1
	R2	a1b2	48	1	25	29	
T3	R1	a2b1	48	1	25	29	3,5
	R2	a2b1	48	6	25	29	
T4	R1	a2b2	48	1	25	29	1
	R2	a2b2	48	1	25	29	

Tratamiento	Rep	Código	Tiemp (h)	Cer 62			
				halo de inhibición (mm)			
				halo de inhibición (mm)	Ciprofloxacina	Estreptomicina	Promedio
T1	R1	a1b1	48	1	25	29	1
	R2	a1b1	48	1	25	29	
T2	R1	a1b2	48	1	25	29	1
	R2	a1b2	48	1	25	29	
T3	R1	a2b1	48	1	25	29	1
	R2	a2b1	48	1	25	29	
T4	R1	a2b2	48	8	25	29	8,5
	R2	a2b2	48	9	25	29	

Tratamiento	Rep	Código	Tiemp (h)	Cer 61			
				halo de inhibición (mm)			
				halo de inhibición (mm)	Ciprofloxacina	Estreptomicina	Promedio
T1	R1	a1b1	48h	0	27	31	0
	R2	a1b1	48h	0	27	31	
	R1	a1b2	48h	0	27	31	
T2	R2	a1b2	48h	0	27	31	0
	R1	a2b1	48h	11	27	31	
T3	R2	a2b1	48h	7	27	31	9
	R1	a2b2	48h	4	27	31	
T4	R1	a2b2	48h	4	27	31	7
	R2	a2b2	48h	10	27	31	

Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales contra las cepas de *Salmonella*.

Tratamiento	Rep	Código	Tiemp (h)	Suelo 58			
				halo de inhibición (mm)			
				halo de inhibición (mm)	Ciprofloxacina	Estreptomicina	Promedio
T1	R1	a1b1	24	1	25	19	1
	R2	a1b1	24	1	25	19	
T2	R1	a1b2	24	1	19	15	1
	R2	a1b2	24	1	19	15	
T3	R1	a2b1	24	3	20	19	3
	R2	a2b1	24	3	20	19	
T4	R1	a2b2	24	5	22	19	5
	R2	a2b2	24	5	22	19	

Tratamiento	Rep	Código	Tiemp (h)	S7			
				halo de inhibición (mm)			
				halo de inhibición (mm)	Ciprofloxacina	Estreptomicina	Promedio
T1	R1	a1b1	24	1	29	18	1
	R2	a1b1	24	1	29	18	
T2	R1	a1b2	24	1	26	16	1
	R2	a1b2	24	1	26	16	
T3	R1	a2b1	24	7	19	15	6
	R2	a2b1	24	5	19	15	
T4	R1	a2b2	24	7	22	15	6,5
	R2	a2b2	24	6	22	15	

Tratamiento	Rep	Código	Tiemp (h)	Sm3			
				halo de inhibición (mm)			
				halo de inhibición (mm)	Ciprofloxacina	Estreptomicina	Promedio
T1	R1	a1b1	24	1	22	19	1
	R2	a1b1	24	1	22	19	
T2	R1	a1b2	24	3	26	19	2
	R2	a1b2	24	1	26	19	
T3	R1	a2b1	24	7	25	19	8
	R2	a2b1	24	9	25	19	
T4	R1	a2b2	24	8	22	19	7
	R2	a2b2	24	6	22	19	

Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales contra las cepas de *Listeria*.

Tratamiento	Rep	Código	Tiemp (h)	L.28			
				halo de inhibición (mm)			
				halo de inhibición (mm)	Ciprofloxacina	Estreptomicina	Promedio
T1	R1	a1b1	24	1	40	38	1
	R2	a1b1	24	1	40	38	
T2	R1	a1b2	24	1	37	23	1
	R2	a1b2	24	1	37	23	
T3	R1	a2b1	24	27	40	26	34,5
	R2	a2b1	24	42	40	26	
T4	R1	a2b2	24	29	38	34	31
	R2	a2b2	24	33	38	34	

Tratamiento	Rep	Código	Tiemp (h)	PT1			
				halo de inhibición (mm)			
				halo de inhibición (mm)	Ciprofloxacina	Estreptomicina	Promedio
T1	R1	a1b1	24	2	25	20	2,5
	R2	a1b1	24	3	25	20	
T2	R1	a1b2	24	6	30	23	5
	R2	a1b2	24	4	30	23	
T3	R1	a2b1	24	39	42	38	39,5
	R2	a2b1	24	40	42	38	
T4	R1	a2b2	24	40	38	30	40
	R2	a2b2	24	40	38	30	

Tratamiento	Rep	Código	Tiemp (h)	L.36			
				halo de inhibición (mm)			
				halo de inhibición (mm)	Ciprofloxacina	Estreptomicina	Promedio
T1	R1	a1b1	24	1	39	36	1
	R2	a1b1	24	1	39	36	
T2	R1	a1b2	24	1	39	35	1
	R2	a1b2	24	1	39	35	
T3	R1	a2b1	24	25	34	30	25
	R2	a2b1	24	25	34	30	
T4	R1	a2b2	24	25	34	30	25
	R2	a2b2	24	25	34	30	

Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales contra las cepas de *Arcobacter*.

Tratamiento	Rep	Código	Tiemp (h)	Q3NC2			
				halo de inhibición (mm)			
				halo de inhibición (mm)	Ciprofloxacina	Estreptomicina	Promedio
T1	R1	a1b1	48	1	29	15	1
	R2	a1b1	48	1	29	15	
T2	R1	a1b2	48	1	30	12	1
	R2	a1b2	48	1	30	12	
T3	R1	a2b1	48	25	25	29	27,5
	R2	a2b1	48	30	25	29	
T4	R1	a2b2	48	16	15	6	15,5
	R2	a2b2	48	15	15	6	


Tratamiento	Rep	Código	Tiemp (h)	Q1NC1			
				halo de inhibición (mm)			
				halo de inhibición (mm)	Ciprofloxacina	Estreptomicina	Promedio
T1	R1	a1b1	48	39	44	33	30
	R2	a1b1	48	21	44	33	
T2	R1	a1b2	48	3	44	33	5
	R2	a1b2	48	7	44	33	
T3	R1	a2b1	48	35	44	33	32
	R2	a2b1	48	29	44	33	
T4	R1	a2b2	48	40	44	33	40
	R2	a2b2	48	40	44	33	

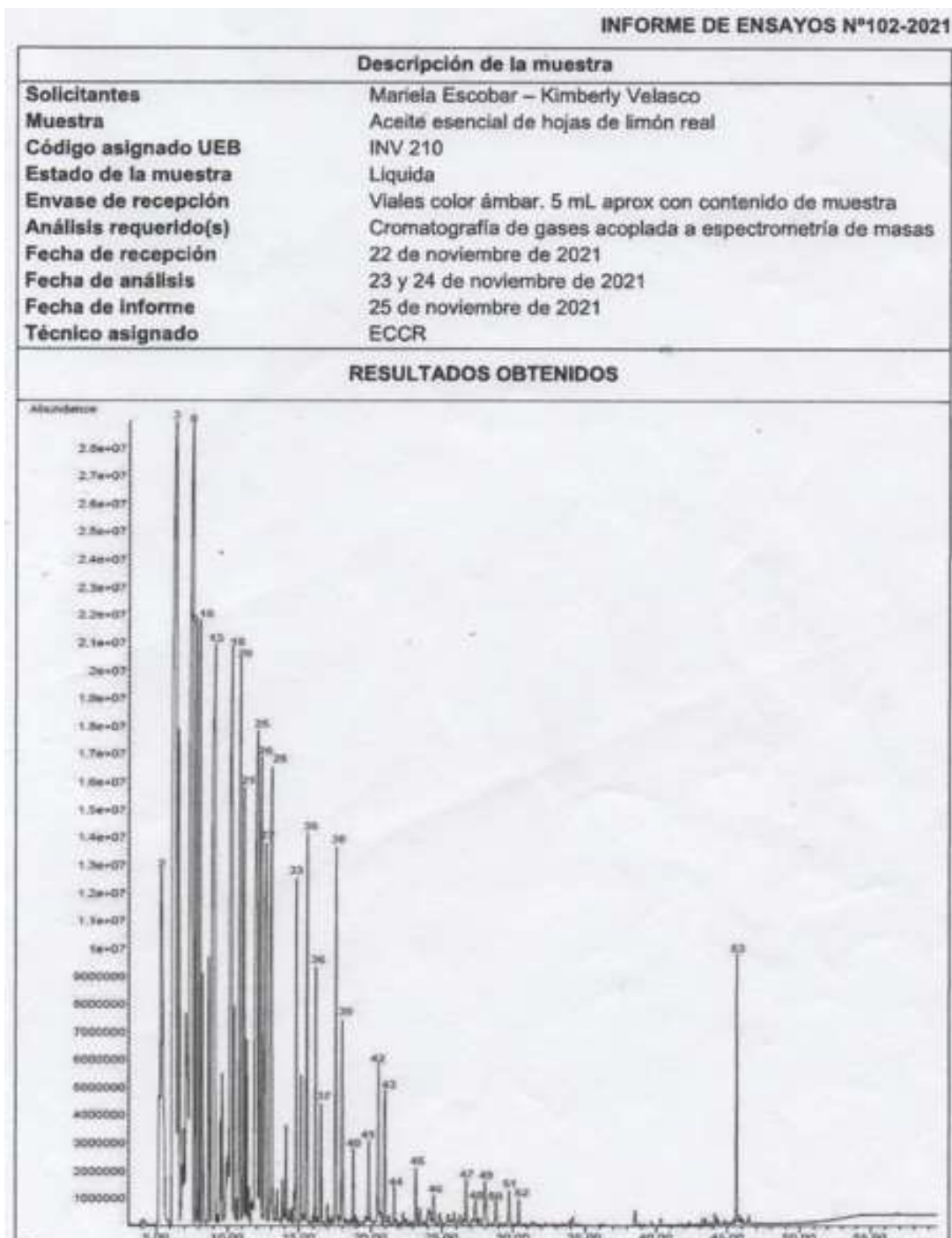
Tratamiento	Rep	Código	Tiemp (h)	Q18BC1			
				halo de inhibición (mm)			
				halo de inhibición (mm)	Ciprofloxacina	Estreptomicina	Promedio
T1	R1	a1b1	48	43	39	24	34
	R2	a1b1	48	25	39	24	
T2	R1	a1b2	48	33	40	12	19,5
	R2	a1b2	48	6	40	12	
T3	R1	a2b1	48	46	44	38	46
	R2	a2b1	48	46	44	38	
T4	R1	a2b2	48	46	44	38	46
	R2	a2b2	48	46	44	38	

Anexo 3. Resultados de la capacidad de actividad antioxidante en los aceites esenciales.

Abs control oxidante	Abs Sample	Treatment	Concentration (mg/ml)	% of kidnapped peroxide	Media %
0,043	0,032	A1B1	50	25,58	25,58
0,043	0,273	A1B1	50	25,58	
0,046	0,038	A1B1	100	17,39	16,30
0,046	0,039	A1B1	100	15,22	
0,023	0,017	A1B2	50	26,09	26,09
0,023	0,035	A1B2	50	26,09	
0,04	0,023	A1B2	100	42,50	47,29
0,048	0,023	A1B2	100	52,08	
0,037	0,034	A2B1	50	8,11	9,18
0,039	0,035	A2B1	50	10,26	
0,035	0,023	A2B1	100	34,29	30,00
0,035	0,026	A2B1	100	25,71	
0,02	0,011	A2B2	50	45,00	48,82
0,019	0,009	A2B2	50	52,63	
0,027	0,02	A2B2	100	25,93	36,04
0,026	0,014	A2B2	100	46,15	


Anexo 4. Resultados de los compuestos volátiles del aceite esencial de hojas de limon Real por Cromatografía de gases.

 DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN	LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN <small>Laguacoto II, Km 1 1/2, vía a San Simón, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador.</small>	Código	FPG12-01
		Versión	1
	INFORME DE RESULTADOS	Año	2021
		Página	Página 1 de 4



 UEB UNIVERSIDAD ESTADAL DE BOLÍVAR	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN	LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN <small>Laguacoto II, Km 1 1/2, vía a San Simón, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador.</small>	Código	FPG12-01
		INFORME DE RESULTADOS	Versión	1
			Año	2021
			Página	Página 2 de 4

N.º	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Área (%)
1	β -Thujene	5,218	0,89
2	1R- α -Pinen	5,335	4,18
3	Sabinene	6,356	14,21
4	β -Myrcene	6,525	3,74
5	ψ -Limonene	6,805	0,34
6	3-Carene	6,826	0,50
7	Terpinolene	7,064	2,48
8	D-Limonene	7,551	12,09
9	β -Ocimene	7,821	3,54
10	γ -Terpinene	8,081	2,39
11	trans-Sabinene hydrate	8,219	1,06
12	α -Terpinolene	8,675	1,16
13	Linalool	9,104	7,58
14	cis-2-p-Menth-1-ol	9,490	0,34
15	4-trans,5-cis-Allocimene	9,596	0,61
16	6-Octenal, 7-methyl-3-methylene-	9,952	0,47
17	Isopulegol	10,028	0,31
18	Citronellal	10,202	5,98
19	Isoneeral	10,437	0,68
20	Terpinen-4-ol	10,674	3,88
21	α -Terpineol	11,131	1,68
22	cis-p-Menth-1-en-3-ol	11,214	0,13
23	Terensantalol	11,296	0,75
24	trans-Fipentol	11,454	0,15

 UNIVERSIDAD ECUATORIANA DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN	LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN <small>Lepanto 3, Km 1 A2, Vía a San Sebastián, Cuenca Guaymas, Provincia Sucre, Ecuador.</small>	Código	FP012-01
		Versión	1
		Año	2021
		Página	Página 4 de 4
INFORME DE RESULTADOS			

49	α -Cadinol	25,013	0,42
50	Isolongifolol	28,778	0,18
51	α -Bisabolol	29,712	0,21
52	2,6,11-Dodecatrienal, 2,6-dimethyl -10-methylene-	30,392	0,15
53	Phytol	45,618	0,76

Los resultados de los análisis corresponden a 3 determinaciones por muestra.
 Compuestos identificados con la Librería NIST14, L.



Ing. Marcelo Vilcacundo Chamorro.
 Director DIVUEB
 Teléf. (+593) 98 721 5594

Anexo 5. Fotografías de la fase experimental.



Recolección de la materia prima



Lavado



Secado



Troceado



Pesado

Anexo 6. Destilación por arrastre de vapor.



Extracción del aceite



Decantación

Anexo 7. Destilación fraccionada.

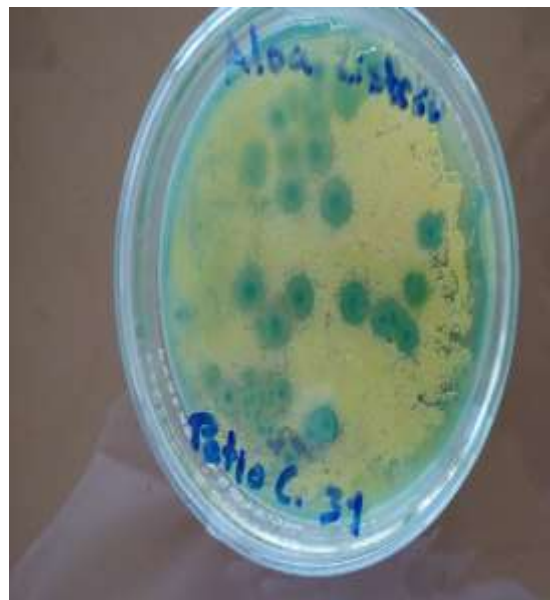


Extracción del aceite



Aceite esencial

Anexo 8. Análisis de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.



Reanimación bacteriana

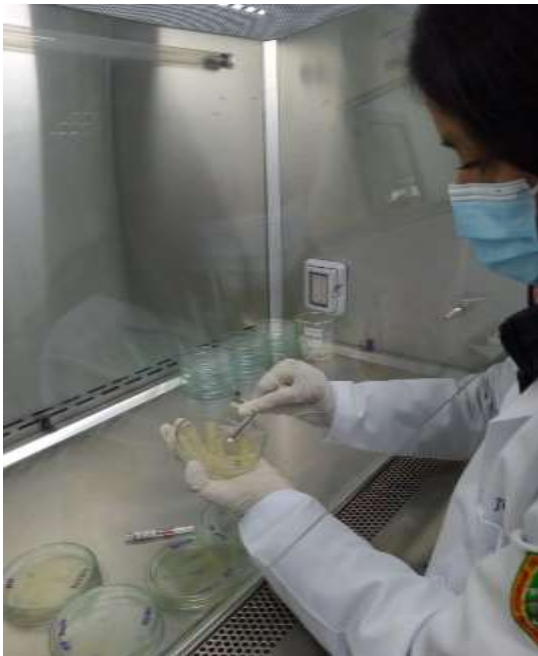
Evaluación antimicrobiana por el método Kirby Bauer



Preparación del medio



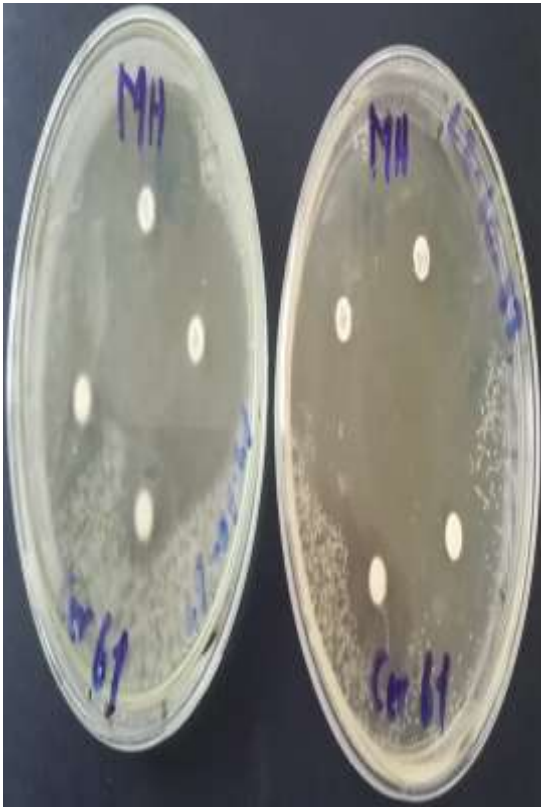
Siembra de microorganismos



Empleo de disco antibiogramas



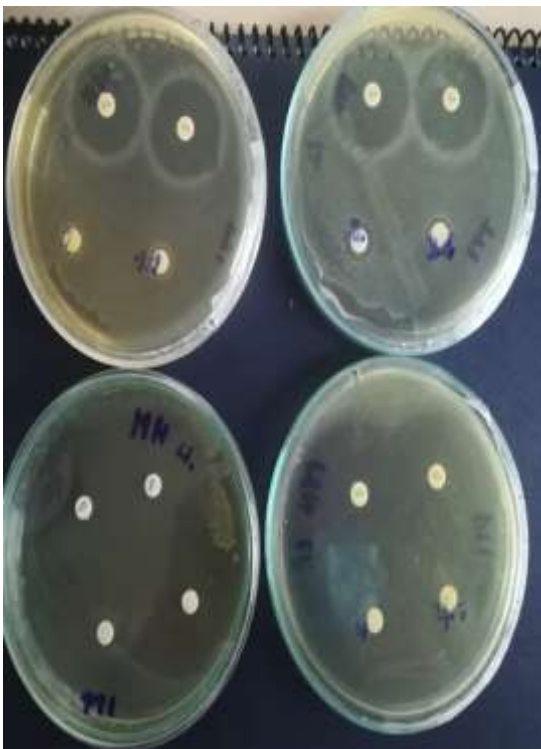
Incubación



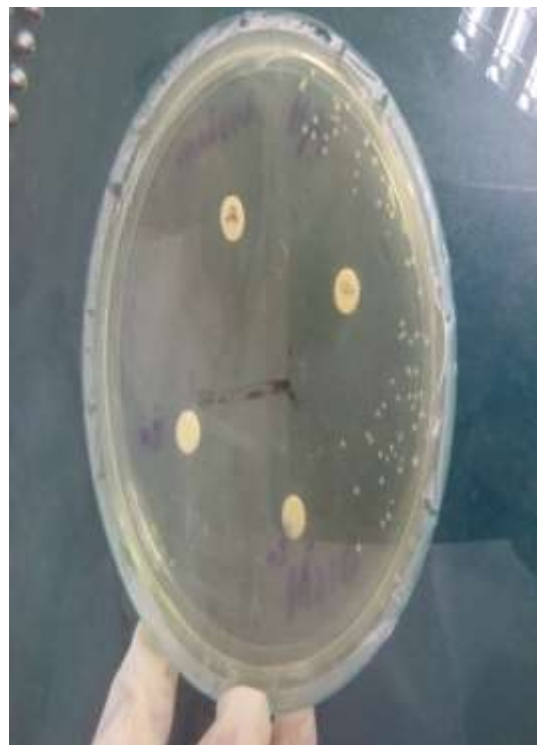
Actividad antimicrobiana de *E. Coli*



Actividad antimicrobiana de *Salmonella*



Actividad antimicrobiana de *Listeria*



Actividad antimicrobiana de *Arcobacter*

Anexo 9. Análisis de actividad antioxidante de los aceites esenciales.



**Espectrofotómetro visible
GENESYS™ 10S.**



Preparación de la muestra



Determinación de la absorbancia



Anexo 10. *Análisis de compuestos volátiles en los aceites esenciales por Cromatografía de gases.*



Cromatógrafo de gases



**Ingreso de patrones de análisis
para cromatografía**

Anexo 11. *Glosario de términos.*

Alifáticos. - Se emplea en el ámbito de la química para calificar a esos compuestos orgánicos que disponen de una cadena abierta como composición de sus moléculas. De esta manera, es viable dialogar de diferentes compuestos de tipo alifático.

Anaerobiosis. - Es la Capacidad que tienen ciertos organismos, como hongos, bacterias, parásitos, etc., para vivir sin oxígeno molecular independiente.

Antibacteriano. - Es una sustancia que impide y destruye en desarrollo de bacterias, antibiótico utilizado para el tratamiento de enfermedades bacterianas.

Antibiograma. - Se refiere al estudio de la sensibilidad a fármacos de bacterias y hongos, si es que existen son aislados y posteriormente separados del resto de microorganismos presentes.

Antioxidante. - Es una molécula que ayuda a retrasar o prevenir la oxidación de otras moléculas, las reacciones de oxidación producen radicales que empiezan reacciones que dañan las células.

Ápice. - Tiene relación con la punta, el vértice, el pico o el extremo de una cosa generalmente se suele utilizarse dentro de la botánica para nombrar a la punta de un fruto o de una hoja.

Cítrico. – Hace referencia al ácido de sabor ácido, bastante soluble en el agua, de la cual se separa, al evaporarse ésta, en gruesos cristales incoloros.

Ebullición. – Es aquel que tiene relación con la acción e impacto de hervir, que se basa en el proceso físico en el que una sustancia pasa del estado líquido al gaseoso, por medio del crecimiento de la temperatura en la integridad de la masa líquida.

Espectrofotometría. – Esta técnica ayuda a medir la cantidad de luz absorbida por una sustancia química, midiendo la magnitud de la luz una vez que un haz luminoso pasa por medio de la solución muestra.

Extracción. - Consiste en obtener compuestos puros a partir de una mezcla ya sea sólida o líquida, mediante la aplicación de diferentes técnicas, donde se aprovecha las diferencias de solubilidad de la materia base.

Flavonoides. - Es un término con el que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas, siendo un grupo de fitonutrientes que se localiza en muchas verduras, frutas, y especias.

Fenoles. - Son compuestos orgánicos donde su estructura molecular tiene al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo.

Inhibición. - Se apoya en suspender transitoriamente una funcionalidad o actividad del organismo por medio de la acción de un estímulo conveniente.

Inmiscibles. – Es aquel que no puede mezclarse con otra sustancia, el agua y el aceite son inmiscibles.

Inoculo. - sustancia que se introduce en medios de cultivo para determinar alguna acción esperada.

Microerofilia. - Son microorganismos que, para sobrevivir necesitan niveles de oxígeno bastante inferiores a los que se hallan comúnmente en la atmósfera de la tierra.

Monoterpenos. - Estos son terpenoides, conocidos como componentes de esencias volátiles como parte de los aceites esenciales de hierbas y especias, estos forman parte de hasta el 5% de la planta seca.

Pecíolo. - Es la característica determinante para la identificación de una planta, siendo este el rabillo que une la lámina de una hoja a su base foliar o al tallo.

Pedúnculo. - Se lo conoce a la rama o rabillo que sostiene la flor solitaria o inflorescencia de una planta. Además, se sabe por pedúnculo la expansión del tallo de la que penden los frutos.

Sapindales. - Es un orden de plantas dicotiledóneas, actualmente incluye a la clasificación de familias como citrus y cítricos caracterizándose por tener dos vertidos de estambres.

Sistema inmunológico. -Es una red de células órganos y tejidos, los mismos que ayudan a combatir infecciones, esto es cuando los gérmenes como virus y bacterias atacan el cuerpo.

Semivolátiles. – Son moléculas con volatilidad intermedia, que los convierte en numerosos tanto en etapa vapor como en etapa condensada a presiones y temperaturas ambiente.

Queratinocitos. - Es el tipo de célula primordial de la epidermis. Estas células generan una fundamental proteína llamada queratina que ayuda a la dermis a defender lo demás corporal.

Quinolonas. - Son antibióticos sintéticos usados para el procedimiento de un extenso espectro de infecciones bacterianas en medio de las que se integran infecciones de las vías urinarias y respiratorias.