

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA



**Actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de la cáscara  
de *Citrus paradisi* Macfad (Toronja) frente a *Aspergillus niger***

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico

TESISTAS:

BACHILLER VILCHEZ TORRES, ROSARIO DEL PILAR

BACHILLER ALAYO DEZA, JESSICA

ASESOR: Mg. JACINTO HERVIAS, PEDRO

Lima – Perú

2019

## **AGRADECIMIENTO**

A nuestro asesor Q.F. Fernando Villa Gonzales por brindarnos sus conocimientos y ser nuestra guía en la realización de nuestra tesis.

## **DEDICATORIA**

A Dios por ser el inspirador y darnos la fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de nuestros sueños más anhelados.

A nuestras familias por haber sido nuestro apoyo a lo largo de toda nuestra carrera.

# ÍNDICE

<b>CAPITULO I : PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>Pág.</b>
1.1 Descripción de la realidad problemática	1
1.2 Formulación del problema	1
1.2.1. Problema General	1
1.2.2. Problema específico	2
1.3 Objetivos de investigación	2
1.3.1. Objetivo General	2
1.3.2. Objetivos específicos	2
1.4 Justificación e importancia del estudio	2
<b>CAPITULO II: MARCO TEÓRICO</b>	
2.1 Antecedentes del estudio	4
2.1.1. Nacionales	4
2.1.2. Internacionales	5
2.2 Bases Teóricas	6
2.3 Hipótesis	11
2.3.1 Hipótesis general	11
2.3.2 Hipótesis específicas	11
2.4 Variables	11
2.4.1. Tabla de operacionalización de variables	13
2.5 Marco Conceptual	14
<b>CAPITULO III: METODOLOGÍA</b>	
3.1 Tipo de estudio	15
3.2 Diseño a utilizar	15
3.3 Población	15
3.4 Muestra	16
3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	17
3.6 Procesamiento de datos	18
3.7 Equipos Materiales y Reactivos	18
3.8 Procedimiento experimental	21
<b>CAPITULO IV: RESULTADOS</b>	
4.1 Presentación de resultados	29
4.2 Contrastación de hipótesis	32
4.3 Discusión de resultados	34
<b>CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	
5.1 CONCLUSIONES	37
5.2 RECOMENDACIONES	38

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Tabla de operacionalización de variables	<b>Pág. 13</b>
<b>Tabla 2</b>	Análisis preliminar y ensayos fisicoquímicos del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> Macfad "toronja"	<b>Pág. 29</b>
<b>Tabla 3</b>	Análisis fitoquímico del aceite esencial de toronja.	<b>Pág. 30</b>
<b>Tabla 4</b>	Resultados de la Evaluación antifúngica del aceite esencial de toronja	<b>Pág. 31</b>
<b>Tabla 5</b>	Resultados de la CMI del aceite esencial de toronja frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<b>Pág. 32</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b>	Matriz de consistencia	<b>Pág. 47</b>
<b>Anexo 2</b>	Diseño del estudio	<b>Pág. 48</b>
<b>Anexo 3</b>	Cepa de <i>Aspergillus niger</i>	<b>Pág. 49</b>
<b>Anexo 4</b>	Ficha de observación de análisis fitoquímico	<b>Pág. 52</b>
<b>Anexo 5</b>	Ficha de observación de evaluación antifúngica	<b>Pág. 53</b>
<b>Anexo 6</b>	Formato de Opinión de expertos	<b>Pág. 54</b>
<b>Anexo 7</b>	Formato de Opinión de expertos	<b>Pág. 55</b>
<b>Anexo 8</b>	Constancia de clasificación Taxonómica	<b>Pág. 56</b>
<b>Anexo 9</b>	Equipo de destilación para obtener aceites esenciales método por arrastre de vapor	<b>Pág. 57</b>
<b>Anexo 10</b>	Protocolo de análisis de análisis fitoquímico	<b>Pág. 58</b>
<b>Anexo 11</b>	Protocolo de análisis de actividad antifúngica	<b>Pág. 59</b>
<b>Anexo 12</b>	Fotos de evaluación antifúngica de aceite esencial de la cascara de frutos de toronja 100%	<b>Pág. 60</b>
<b>Anexo 13</b>	Fotos de evaluación antifúngica de aceite esencial de la cascara de frutos de toronja 75%	<b>Pág. 61</b>
<b>Anexo 14</b>	Fotos de evaluación antifúngica de aceite esencial de la cascara de frutos de toronja 50%	<b>Pág. 62</b>
<b>Anexo 15</b>	Fotos de evaluación antifúngica de aceite esencial de la cascara de frutos de toronja 25%	<b>Pág. 63</b>
<b>Anexo 16</b>	Fotos de evaluación antifúngica del control positivo	<b>Pág. 64</b>
<b>Anexo 17</b>	Fotos de evaluación antifúngica del control negativo	<b>Pág. 65</b>
<b>Anexo 18</b>	Protocolo de análisis para determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> Macfad frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<b>Pág. 66</b>
<b>Anexo 19</b>	Fotos para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de <i>Citrus</i>	<b>Pág. 67</b>

	<i>paradisi</i> Macfad frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	
<b>Anexo 20</b>	Fotos de Control positivo (fluconazol) y negativo para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> Macfad frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404.	<b>Pág. 68</b>
<b>Anexo 21</b>	Fotos para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> Macfad a concentraciones de 75% y 80% frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404.	<b>Pág. 69</b>
<b>Anexo 22</b>	Fotos para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> Macfad a concentraciones de 85% y 90% frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404.	<b>Pág. 70</b>
<b>Anexo 23</b>	Fotos para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> Macfad a concentraciones de 95% y 100% frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404.	<b>Pág. 71</b>
<b>Anexo 24</b>	Resultados del análisis estadístico de ANOVA de un solo factor: 25; 50; 75; 100	<b>Pág. 72</b>

## Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial obtenido a partir de la cáscara del fruto de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404. El aceite esencial se obtuvo tratando aproximadamente 40 kg de cáscara de frutos en un sistema de hidrodestilación por arrastre de vapor de agua, obteniéndose un rendimiento de 0,063 mL% v/p, realizándose asimismo el análisis preliminar del aceite esencial y sus propiedades fisicoquímicas: gravedad específica (0,844 g/mL), Índice de Refracción (1,38) y pH (5,4). Así mismo, se realizó la marcha fitoquímica para determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios donde se determinó presencia de aceites, fenoles y triterpenos. Posteriormente, se realizó la determinación de la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de toronja a diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%) utilizando el método de difusión en agar mostrando actividad antifúngica sumamente sensible frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404 a la concentración del 100%, encontrándose una diferencia estadística con  $p < 0,05$ . Finalmente, presentó una concentración mínima inhibitoria al 95%.

Palabras clave: Aceite esencial, *Citrus paradisi*, actividad antifúngica, *Aspergillus niger*



### **Abstract**

The objective of the present study was to evaluate the antifungal activity in vitro of the essential oil obtained from the *Citrus paradisi* "grapefruit" fruit peel against *Aspergillus niger* ATCC 16404. The essential oil was obtained from 40 kg of fruit peel in a system with hydrodistillation drag of water vapor, getting a yield of 0.063 mL% v / p, also performed the preliminary analysis of the essential oils and their physicochemical properties: gravity specific (0.844 g / mL), Refractive Index (1.38) and pH (5.4). The identification of secondary metabolites was performed by qualitative phytochemical analysis showing positive reaction to oil, phenols, triterpens. Subsequently, the determination of the in vitro antifungal activity of grapefruit essential oil at different concentrations (25%, 50%, 75% and 100%) was performed using the agar diffusion method showing extremely sensitive antifungal activity against *Aspergillus niger* ATCC 16404 a 100% concentration, finding a statistical difference with  $p < 0.05$ . Finally, the essential oil had a minimum inhibitory concentration of 95%.

Key words: Essential oil, *Citrus paradisi*, antifungal activity, *Aspergillus niger*

## CAPÍTULO I:

### PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1 Descripción de la Realidad Problemática

El hongo *Aspergillus niger*, crece sobre una amplia gama de materiales orgánicos, deteriorando alimentos al momento de su almacenamiento<sup>1</sup>. Diversos estudios indican que *Aspergillus niger* produce deterioro en mangos, uvas, tomates, manzanas<sup>2</sup>.

El género *Aspergillus* se caracteriza por producir micotoxinas como las aflatoxinas y las ocratoxinas. Las aflatoxinas son mutagénicas, teratogénicas, carcinogénicas, hepatotóxica e inmunosupresoras<sup>3</sup>. Las ocratoxinas son consideradas inmunotóxicas, carcinogénicas, teratogénicas, hepatotóxicas<sup>4</sup>. Dentro de este grupo, la ocratoxina A (OTA) es relevante por su frecuencia y toxicidad<sup>5,6</sup>. Es común a nivel mundial, y puede encontrarse en alimentos como cereales, vino, jugo de uva, pan, cereales, café o productos alimenticios obtenidos de animales<sup>5,7</sup>.

Dentro de las recomendaciones que brinda la OMS es impedir el deterioro de los granos, cereales y alimentos que pueden padecer la contaminación por mohos y, por lo tanto, a la contaminación por micotoxinas<sup>8</sup>, de lo mencionado anteriormente debemos buscar alternativas que impidan la infección de alimentos por hongos del género *Aspergillus* productoras de micotoxinas.

#### 1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

##### 1.2.1. Problema general

¿El aceite esencial extraído de la cáscara del fruto de *Citrus paradisi* Macfad (Toronja) posee actividad antifúngica *in vitro* frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404?

## **1.2.2 Problema específico**

1. ¿Qué tipos de metabolitos presentes en el aceite esencial extraído a partir de la cáscara del fruto de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) serían los posibles responsables de la actividad antifúngica *in vitro* frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404?
2. ¿La concentración del aceite esencial extraído de la cáscara de *Citrus paradisi* Macfad (Toronja) influirá en la actividad antifúngica *in vitro* frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404?

## **1.3 Objetivos de investigación**

### **1.3.1 Objetivo general.**

Evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial extraído a partir de la cáscara del fruto de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) *in vitro* frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404.

### **1.3.2 Objetivos específicos.**

1. Determinar los tipos de metabolitos presentes en el aceite esencial extraído a partir de la cáscara del fruto de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) y su posible relación antifúngica *in vitro* frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404.
2. Determinar la concentración del aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi* (toronja) con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Aspergillus niger*.

## **1.4 Justificación e importancia del estudio**

La búsqueda de aceites esenciales con actividad antifúngica, para utilizarlas en la conservación de las cosechas de cereales, frutas y evitar pérdidas económicas

como en el caso del café donde se han encontrado micotoxinas como la ocratoxinas producidas por *Aspergillus niger*<sup>9</sup>. Se han realizado investigaciones como las realizadas por Viuda Martos y Ruiz (2008)<sup>10</sup>, donde estudiaron el efecto antifúngico de los aceites esenciales obtenidos del género *Citrus* como *Citrus Lemon* L. (limón), *Citrus reticulata* L. (mandarina), *Citrus paradisi* L. (toronja), y *Citrus sinensis* L.(naranja); indicando que todos los aceites esenciales poseen actividad antifúngica pero el extraído de naranja posee mayor actividad en *Aspergillus niger*. También Sharma y Tripathi (2012)<sup>11</sup>, reportaron que el aceite esencial extraído de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L) Osbeck posee actividad antifúngica en el crecimiento y morfología en *Aspergillus niger*. Si se demuestra que el uso de un residuo orgánico como la cáscara de toronja inhibe el crecimiento del hongo *Aspergillus niger* se podría plantear como una alternativa de solución al problema anteriormente descrito.

Considerando lo anteriormente expuesto, la finalidad de la presente investigación es demostrar la actividad antifúngica del aceite esencial obtenido de la cáscara del fruto de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) sobre *Aspergillus niger*.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes del estudio

##### 2.1.1 Nacionales

Corcuera (2017)<sup>12</sup>, estudió el efecto de la concentración del aceite esencial obtenido por el método de arrastre de vapor de las cáscaras del fruto de *Citrus paradisi* L. (toronja) sobre la viabilidad de *Candida albicans in vitro*, reportando que a concentraciones menores de 40 µg/mL no hay formación de halos de inhibición que afecten la viabilidad del hongo, y a concentraciones mayores si se observan halos que afectan su viabilidad.

Gómez (2014)<sup>13</sup>, realizó la evaluación de la actividad de antifúngica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. (naranja) a concentraciones del 1%, 2%, 4% y 8% frente a *Fusarium semitectum*. La concentración del 8% presentó mayor actividad antifúngica con respecto a las otras concentraciones.

Gamboa (2015)<sup>14</sup>, evaluó la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. “naranja” frente a *Trichophyton mentagrophytes* a concentraciones de 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, y 50%, y como control negativo tween 80 al 2% y clotrimazol como control positivo. Se observaron halos de inhibición en todas las concentraciones. El aceite esencial de *Citrus aurantium* L. “naranja” presentó un efecto antimicótico y fungicida frente a la cepa de *Trichophyton mentagrophytes* con mayor claridad a las concentraciones de 30% y 50%.

### 2.1.2 Internacionales

Viuda-Martos (2008)<sup>10</sup>, indica que el aceite esencial de naranja fue el más eficaz frente *Aspergillus niger*, por otro lado el aceite esencial de mandarina fue el más eficaz para reducir el crecimiento de *Aspergillus flavus* mientras que la toronja fue el mejor inhibidor de los mohos *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium verrucosum*.

Liu et al. (2012)<sup>15</sup>, reportó que las cáscaras de frutos cítricos son ricas en flavonas polimetoxiladas (PMF) y son fuentes potenciales de preservantes naturales. Se identificaron y cuantificaron seis extractos con PMF, aislados y purificados de las cáscaras de *Citrus reticulata* y *Citrus sinensis*. Se determinó los efectos inhibitorios sobre *Aspergillus niger* mediante el ensayo de dilución de microbroth. La mandarina roja exhibió la mayor actividad antifúngica (MIC= 0.2 mg /mL), mientras que Jincheng mostró la actividad más baja (MIC =1.8 mg / mL). Se realizó un análisis para establecer las relaciones estructura-actividad de los PMF de cítricos. Los resultados revelaron que, para un buen efecto inhibidor, las funcionalidades se deben a las posiciones de los grupos oxidrilos. Los hallazgos de este estudio proporcionan información importante para la explotación y utilización de los PMF de cítricos como biopreservantes naturales.

Sharma N y Tripathi (2006)<sup>16</sup> indicaron que el aceite esencial extraído del epicarpio de *Citrus sinensis* presenta actividad fungicida ante 10 patógenos postcosecha. Los estudios de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) del aceite revelaron la presencia de 10

constituyentes químicos, de los cuales se encontró que el limoneno es el componente principal (84.2%). La actividad del aceite se probó mediante la técnica de alimentos envenenados y el ensayo de actividad volátil y los aceites mostraron una mayor toxicidad en el ensayo de actividad volátil que en el ensayo de alimentos envenenados. La naturaleza de la toxicidad se estudió en el ensayo de actividad volátil y se observó que el aceite era fungicida para los 10 patógenos en el rango de 700 ppm (mg/l) a 1000 ppm. El aceite era extremadamente tóxico para la germinación de las esporas y se encontró a 700 ppm la germinación de las esporas se inhibía en los 10 hongos de prueba de los 12 probados. El tratamiento a una concentración de 300 ppm mostró una inhibición del 70 al 100% de la germinación de las esporas en la mayoría de los hongos analizados como *Aspergillus niger* y se observó que el tratamiento con el aceite conduce a la distorsión y el adelgazamiento de la pared hifal así como la reducción del diámetro hifal y la ausencia de conidióforos.

## **2.2 Bases Teóricas**

### **2.2.1. Aceites esenciales**

Son combinaciones de compuestos orgánicos, conformados por metabolitos secundarios como sesquiterpenos, terpenos y sustancias aromáticas localizados en flores, frutos, hojas; extraídos por método de destilación denominado arrastre con vapor de agua. Los aceites esenciales son miscibles en solventes orgánicos e inmiscibles en agua <sup>17</sup>.

### **2.2.1.1 Propiedades antibacterianas y antifúngicas de los aceites esenciales**

Desde épocas muy antiguas, se han conocido las propiedades antimicrobianas de algunos aceites esenciales. Los componentes de los aceites esenciales han mostrado también propiedades antivirales, antifúngicas, herbicidas e insecticidas <sup>18,19</sup>.

Existen numerosos estudios que revelan la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, considerando que no todos presentan la misma actividad y esto está en función a sus componentes <sup>20</sup>.

En otro estudio, Dorman y Deans (2000) reportaron la actividad antimicrobiana de los aceites de pimienta negra, clavo, orégano, geranio, nuez moscada y tomillo, indicando que los componentes volátiles podrían contribuir a su actividad. El aceite esencial de tomillo, seguido de orégano, clavo, nuez moscada, geranio y pimienta negra mostraron una eficaz actividad antimicrobiana. La actividad de los aceites esenciales estarían relacionada con la composición de los aceites volátiles de las plantas y sus estructuras químicas, y una posible interacción sinérgica entre sus compuestos. Los elementos con estructura fenólica como carvacrol, eugenol y timol, fueron efectivos frente a los microorganismos <sup>21</sup>.

El uso de aceites esenciales es un método altamente efectivo para controlar plagas tanto en cosecha como en postcosecha. Los aceites esenciales han sido reconocidos por presentar diversas funciones, incluyendo resistencia a plagas y enfermedades; algunos aceites esenciales, así como sus



constituyentes, han demostrado poseer propiedades antibacterianas y antifúngicas <sup>22</sup>.

### **2.2.2 Micotoxinas**

Los hongos crecen sobre las especies vegetales causando problemas en su desarrollo. Éstos producen metabolitos secundarios que actúan como antibióticos colaborando con la prevalencia del hongo frente a otros microorganismos tóxicos para plantas y/o animales. Estos metabolitos denominados micotoxinas enferman o matan a los animales que los consumen, produciendo una afección llamada micotoxicosis. Las micotoxinas son compuestos universales que diferencian por sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas. Una micotoxicosis primaria se origina al consumir vegetales infectados, y secundaria al comer carne o leche de animales que consumieron forrajes con micotoxinas <sup>23</sup>.

### **2.2.3 *Citrus paradisi* Macfad**

Los cítricos comprenden la familia de las Rutáceas, subfamilia Arantoideas, siguiendo la clasificación de Swingle (1967), dicha subfamilia agrupa a dos tribus, seis subtribus y treinta y tres géneros, de entre los cuales sólo se conocen como frutos cítricos a tres: *Fortunella*, *Poncirus* y *Citrus*, así como a sus híbridos. Estos se encuentran clasificados dentro de la tribu de Citreas, subtribu Citrinas, denominando al resto afín a los cítricos <sup>24</sup>.

La clasificación taxonómica de la toronja según Swingle <sup>25</sup>.

División: Embryophyta

Subdivisión: Angiospermas

Clase: Dicotiledoneas

Subclase: Arquiclamideas

Orden: Geraniales

Familia: Rutáceas

Subfamilia: Aurantoideas

Tribu: Citrae

Género: Citrus

Subgénero: Eucitrus

Especie: *Citrus paradisi* Macfad

Nombre común: Toronja

La cáscara del género Citrus contiene flavonoides como flavanonas y polimetoxiflavonas, observados en especies como *Citrus paradisi* Macfad (toronja) y *Citrus sinensis* (naranja), dentro de los flavonoides tenemos a la narangina y hesperidina, respectivamente, también se advierten la presencia de flavonas como la nobiletina y tangeretina. Estudios *in vitro* revelaron que estos compuestos posiblemente actúan como agentes antifúngicos contra *Penicillium digitatum*, las polimetoxiflavonas son más activas que las flavanonas <sup>26</sup>. En el género Citrus encontramos tres tipos de flavonoides como: flavanonas, flavonas, flavonoles, relacionados a disminuir el riesgo de padecer enfermedades

coronarias, prevenir el cáncer y capturar radicales libres, también se describen actividades antiinflamatorias, antimicrobianas <sup>27,28</sup>.

En el Perú, la toronja crece en las regiones de Lima, Ica y su mayor cosecha son en los meses de junio, julio y agosto <sup>29</sup>.

#### **2.2.4 *Aspergillus niger***

Los aspergilos negros son algunos de los contaminantes micotoxigénicos más importantes de los alimentos y los piensos, especialmente en la etapa post cosecha de frutas frescas y secas de ciertos vegetales, nueces, frijoles y cereales. Esto se debe a su rápido crecimiento, tolerancia al pH y alta abundancia en muchos ambientes. La taxonomía y la correcta identificación pueden parecer de baja relevancia, pero en realidad la sistemática es una parte vital de investigación de micotoxinas y seguridad alimentaria. Dado que el perfil del grupo *Aspergillus niger* comprende 18 especies, de las cuales *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. acidus*, *A. carbonarius*, y *A. ibericus* son comunes, mientras que las especies restantes son raras y se encuentran en su mayoría en regiones tropicales. Las micotoxinas y otros metabolitos secundarios son específicos de especie, la identificación correcta a nivel de especie proporciona la clave para planificar la determinación analítica de todos los compuestos relevantes <sup>30,31,32</sup>.

Hasta hace poco, la principal micotoxina del *Aspergillus niger* era la ocratoxina A (OTA), producido en cantidades variables. Por otro lado, ciertas especies del Grupo *A. carbonarius* producen grandes cantidades de OTA, mientras que solo 6-10% de los miembros del grupo *A. niger* produce OTA <sup>33,34</sup>.

*Aspergillus niger* posee la más amplia distribución y se ha reportado por crecer y dañar un número mucho mayor de alimentos en todo el mundo, incluyendo maíz, maní, pasas, cebollas, mango, manzanas, y productos cárnicos secos <sup>35</sup>.

Las especies del género *Aspergillus* se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza lográndose aislar de una gran diversidad de sustancias. Por la fácil dispersión de sus conidios y su tamaño, éstos pueden perdurar en suspensión en el ambiente durante un largo periodo de tiempo, por lo que el hombre se encuentra expuesto continuamente a su inhalación <sup>36</sup>.

## **2.3 Hipótesis**

### **2.3.1 Hipótesis general**

El aceite esencial extraído de la cáscara de los frutos frescos de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) poseen actividad antifúngica *in vitro* frente a cepas de *Aspergillus niger* ATCC 16404.

### **2.3.2 Hipótesis Específicas**

1. El aceite esencial extraído de la cáscara de los frutos frescos de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) posee metabolitos responsables de la actividad antifúngica *in vitro* frente a cepas de *Aspergillus niger* ATCC 16404.
2. La concentración del aceite esencial extraído de la cáscara de los frutos frescos de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) influye en la actividad antifúngica *in vitro* frente a cepas de *Aspergillus niger* ATCC 16404.

## **2.4 VARIABLES**

### **Variable Independiente**

El aceite esencial extraído de la cáscara de los frutos frescos de *Citrus paradisi* Macfad (toronja).

**Variable dependiente**

Actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial extraído de las cáscaras de los frutos frescos de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404.

## 2.4.1 Tabla 1 Operacionalización de variables

### Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICION	NATURALEZA O TIPO	ESCALA O MEDICION	INDICADOR	INTERRELACION
aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> Macfad (toronja).	Metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial	Cualitativa	Concentración porcentual (%)	Concentración del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> Macfad (toronja). 25% 50% 75% 100%	independiente
actividad antifúngica <i>in vitro</i> del aceite frente a <i>Aspergillus niger</i> .	Suceptibilidad de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 ante el aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> Macfad (toronja).	Cuantitativa	Escala milimétrica por vernier (mm)	Se observó los halos de inhibición del aceite frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	dependiente
	Concentración Mínima Inhibitoria (CIM): Se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), mediante el uso del contador de colonias	Cuantitativa	Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Ausencia de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	dependiente

## 2.5 Marco conceptual

- 1. Aceite esencial:** Líquido oleoso volátil, generalmente insaponificable, poco soluble, contiene terpenos, alcoholes, cetonas, fenoles, ácidos, aldehídos, éteres, se encuentran generalmente en las flores, hojas y tallos de plantas <sup>37</sup>.
- 2. Destilación:** Separación de una mezcla de varios componentes aprovechando sus distintas volatilidades, o bien separar los materiales volátiles de los no volátiles <sup>38</sup>.
- 3. Destilación por arrastre de vapor con agua:** Destilación por medio de una corriente de vapor que arrastra selectivamente algunos compuestos de la mezcla <sup>39</sup>.
- 4. Escala de McFarland:** También conocidos como estándares de turbidez McFarland utilizados como referencia en suspensiones microbiológicas para saber que la cantidad de microorganismos por unidad de volumen, o UFC según escala que va de 0,5 a 10. Estos estándares son preparados a partir de soluciones de bario al 1% con ácido sulfúrico al 1% en volúmenes específicos, que pueden ser controlados usando espectrofotómetros <sup>40</sup>.
- 5. Hongo:** Organismo eucariota que pertenece al reino fungi <sup>41</sup>.
- 6. Agar Sabouraud:** Medio adaptado para cultivar la mayoría de levaduras y hongos patógenos, contiene una cantidad mínima de nutrientes y un pH ácido (5,6) que lo hace exclusivo <sup>42</sup>.

## **CAPITULO III**

### **METODOLOGIA**

#### **3.1 Tipo del estudio**

**Experimental:** Se evaluó el efecto de las variables a manipular en las condiciones de la investigación que será llevada a cabo *in vitro*.

**Observacional:** Debido a que se utilizó la observación asimismo se registró los diferentes acontecimientos sin intervenir en el curso de estos.

**Transversal:** Debido a que la observación de las variables se desarrolló en un período de tiempo determinado y delimitado.

#### **3.2 Diseño a utilizar**

Esta investigación tiene un diseño experimental, la especie vegetal fue tratada a experimento microbiológico "*in vitro*" (anexo 2)

#### **3.3 Población**

##### **3.3.1 Población microbiológica:**

Estuvo conformada por Cepas de *Aspergillus niger* o *Aspergillus brasiliensis* ATCC16404 (anexo 3).

##### **3.3.2 Población vegetal**

Constituidas por las cáscaras de toronja de donde se extrajo el aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad (Toronja), compradas en el mercado Central Mayorista de Lima Metropolitana.



### **3.4 Muestra**

Según Villa G (2017), a partir de 25 Kg de cáscara de toronja se obtuvo 33mL de aceite esencial. Estos valores indicaron un rendimiento de 0,13 mL% v/p, y es acorde al método de hidrodestilación que oscila entre 0,01 hasta 0,5 mL aceite / Kg toronja. De lo anterior, para el presente trabajo se considera una muestra de 30 Kg de cáscara para obtener un aproximado de 35 a 40 ml de aceite esencial y así cumplir con los objetivos planteados <sup>43,44</sup>.

#### **3.4.1 Técnicas e instrumentos de recolección de la muestra**

Se confeccionó una ficha de datos en donde se apuntaron los resultados del método microbiológico. La recolección de los datos se realizó de forma manual y observación directa.

Para la medición de los halos se utilizó el instrumento vernier calibrado en milímetros. Se verificó cada una de las fichas para evitar errores u omisiones en los resultados que pudieran perjudicar la investigación.

Para los resultados en la evaluación antifúngica se tomó como referencia las pautas por Duraffourd (1983)<sup>45</sup> escala utilizada para determinar el efecto inhibitorio in vitro, según diámetro de inhibición en el que podemos indicar lo siguiente:

- Nula (-) para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible +) para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- Medio (muy sensible ++) para un diámetro entre 14 y 20 mm.
- Sumamente sensible (+++) para un diámetro superior a 20 mm.

### **3.4.2 Delimitación de la muestra**

Los frutos de toronja han sido compradas del mercado central. Los vendedores mayoristas manifiestan que los frutos provienen de la ciudad de Huaral localizada al norte de la región Lima. Una vez comprado la toronja se procedió a trasladarla al laboratorio de Farmacognosia de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y realizar la extracción de su aceite esencial.

### **3.5 Instrumentos de recolección de datos**

Los instrumentos utilizados para la recolección de datos del análisis fitoquímico y estudio microbiológico fue una ficha de observación Ad-hoc (Anexo 4 y 5)

El instrumento empleado se denominó fichas de observación Ad-hoc, estas son factibles por su sencillez en su aplicación por parte del investigador. Asimismo se validó las fichas previas a su aplicación final, la cual se establecerá considerando su viabilidad, validez y confiabilidad.

La validez de la estructura y contenido de las fichas de observación Ad-hoc de recolección de datos se realizó mediante la evaluación por juicio de dos expertos (Anexo 6 y 7) para ello se entregó la matriz de consistencia (anexo 1).

La validez de contenido se obtuvo mediante la evaluación por juicio de expertos que son los siguientes:

- ✓ Q.F. Bellido Achahui, Cristofer Johel
- ✓ Mg. Q.F. Villa Gonzales, Guillermo Fernando

### **3.6 Procesamiento de datos**

En el presente trabajo de investigación se calculó la media y desviación estándar que son presentadas en tablas y gráficos. Los resultados de los halos inhibición se presentan mediante tablas y gráficos, siendo procesados mediante estadísticos para la comparación de medias entre las diferentes concentraciones del aceite esencial.

Para la contrastación de hipótesis, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer si existen diferencias significativas entre los grupos a un intervalo de confianza de 95% de confianza. Todos los datos han sido procesados con el Software estadístico Minitab®19.

### **3.7 Equipos materiales y reactivos materiales, insumo, reactivos y equipos**

#### **1. Análisis fitoquímico**

##### **Materiales**

- Tubos de ensayo de 16 x 150 mm
- Gradilla de metal para tubos
- Pipetas de capacidad de 5 cc
- Pipetas de Pasteur
- Fracos goteros

##### **Reactivos**

- Reactivo de Sudan III
- Solución de hidróxido de sodio
- Reactivo de Baljet
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer

- Reactivo de Shinoda
- Reactivo de Liebermann
- Cloruro férrico al 5% en solución acuosa
- Ácido sulfúrico concentrado
- Anhidrido acético.

## **2. Evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de toronja**

### **Materiales**

- Vernier digital Caliper Model: DC-515
- Placas Petri de vidrio 90mm de diámetro x 15mm de altura
- Asa de Drigalsky de vidrio
- Tubos 150mm con tapa rosca
- Viales de vidrio de 5mL de capacidad
- Puntas para micropipeta de 20-200  $\mu$ L
- Puntas para micropipeta de 0.5-5mL
- Micropipeta calibrada de 20-200 $\mu$ L
- Micropipeta calibrada de 0.5-5mL
- Frascos de vidrio de 500mL de capacidad con tapa rosca
- Frascos de vidrio de 200mL de capacidad con tapa rosca
- Viales de vidrio de 10mL de capacidad.
- Gradilla
- Espátulas
- Sacabocado con diámetro interno de 6mm
- Papel craft
- Asa bacteriológica
- Escala de MacFarland

- Baguetas de vidrio
- Indicador multiparámetro de esterilización.

## **Insumos**

### **a) Medios de cultivo**

- Caldo Trypticase Soya (TSB) marca OXOID
- Agar Sabouraud dextrose marca OXOID

### **b) Inóculo**

- *Aspergillus niger* o *Aspergillus brasiliensis* ATCC16404

## **Reactivos**

- Agua destilada
- Cloruro de sodio grado bacteriológico
- Alcohol 96°
- DMSO (Dimetilsulfóxido)

## **Equipos**

- Equipo destilador tipo artesanal.
- Incubadora 35°C EQ-CCA-026 Labor LP-11 S: 69-6315/4
- Autoclave Vertical Digital EQ-CCA-054 Reles AL/D 50L S: 476-15
- Potenciómetro EQ-CCA-005 Inolab 730 S: 10380849
- Baño María EQ-CCA-009 Memmert WNE-10 S: L307.0363
- Balanza analítica Marca A&D Compan Limited
- Estufa EQ-CCA-001 Memmert UN55 S: B215-2490
- Mechero Bunsen

### **3.8 Procedimiento experimental**

#### **3.8.1 Colecta de la especie vegetal**

Los frutos de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) fueron obtenidos del mercado central de Lima, siendo su procedencia en la ciudad de Huaral-Perú, durante el mes de abril del 2019. Se seleccionaron los frutos de toronja en su estado de madurez de color amarillo, el epicarpio del fruto fue retirado manualmente con un cuchillo para luego extraer el aceite esencial. La clasificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la UNMSM (Ver anexo 8).

#### **3.8.2 Extracción del aceite esencial**

La cáscara de los frutos frescos de *Citrus paradisi* Macfad, fueron tratados en un equipo artesanal de acero inoxidable para realizar la destilación por arrastre de vapor con agua, recibiendo el aceite en una probeta (ver anexo 9). La deshidratación del aceite esencial se realizó con sulfato de sodio anhidro grado reactivo, con posterior filtración y conservación del aceite en un frasco de vidrio de color ámbar a temperatura de 4°C<sup>46</sup>.

#### **3.8.3 Rendimiento del aceite esencial**

El volumen de aceite esencial obtenido en la probeta florentino fue 25 mL, utilizando el método gravimétrico-volumétrico se determinó el porcentaje de rendimiento .

El porcentaje de rendimiento se obtiene con la siguiente expresión:

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

Donde:

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

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

### **3.8.4 Análisis preliminar y fisicoquímico<sup>47</sup>**

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

### **3.8.5 Análisis fitoquímico o Marcha fitoquímica del aceite esencial de toronja<sup>48</sup>.**

A una muestra del aceite esencial de toronja se le realizó las siguientes pruebas:

#### **a) Identificación de aceites:**

Para identificar aceites se utiliza el reactivo dinitrofenilhidrazina que permite reconocer la presencia de grupos carbonilos en la muestra proveniente de un aldehído o una acetona, se considera positiva si aparece un precipitado amarillo.

#### **b) Identificación de grasas:**

El ensayo de Sudán III, permite reconocer en una muestra de aceite esencial la presencia de compuestos lipofílicos, se considera positiva si aparece una película color rojo en las paredes del tubo de ensayo.

#### **c) Identificación de Lactonas:**

El ensayo de Baljet, permite identificar en una muestra la presencia de grupos químicos lactónicos como cumarinas, aunque otros compuestos láctónicos pueden dar también positivo a este ensayo. Ante estos resultados se considera la presencia de esta familia de compuestos por la aparición de una coloración y un precipitado.

#### **d) Identificación de alcaloides**

Se indican dos maneras para la identificación de alcaloides:

A la muestra problema, se le adicionó el reactivo de Dragendorf, si la reacción es positiva, da un precipitado naranja a rojo.

A la muestra problema, se le adicionó el reactivo de Wagner, si la reacción es positiva, da un precipitado blanco o crema.

#### **e) Identificación de flavonoides**

En esta reacción, aplicamos el reactivo de Shinoda a 1 ml de muestra, la reacción entre el magnesio metálico y el ácido produce burbujeo y coloraciones que van desde amarillo hasta rojo.

#### **f) Identificación de fenoles – Reacción de Cloruro férrico**

Llevar a seco 1 ml de aceite esencial de toronja calentando a Baño María (se puede hacer directamente sin llevar a seco). El residuo seco se disuelve en 1 ml de agua destilada y se le agregan 3 gotas de  $\text{FeCl}_3$  al 1% acuoso. La aparición de coloración varía de acuerdo a la cantidad y posición de los oxhidrilos fenólicos presentes: amarilla indica la presencia de 1-OH, verde grisácea 2 -OH adyacentes y azul negro 3 -OH adyacentes.

#### **g) Identificación de triterpenos**

Mezclar con cuidado 1,8 ml de anhídrido acético con 0,2 ml de ácido sulfúrico concentrado en medio anhidro. Tomar 0,2 ml del aceite esencial de toronja y agregar 0,2 ml del reactivo de Liebermann-Burchard. Se observará una coloración

#### **h) Identificación de carotenos o tetraterpenoides**

Mezclar con cuidado 1,8 ml de anhídrido acético con 0,2 ml de ácido sulfúrico concentrado en medio anhidro. Tomar 0,2 ml del aceite esencial de toronja y agregar 0,2 ml del reactivo de Liebermann-Burchard. Se observará una coloración entre las tonalidades amarillo-naranja-rojo.



### **3.8.6.1 Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de toronja por el método de difusión en agar <sup>49,50</sup>**

#### **I. Fase Pre analítica**

##### **Preparación de Materiales**

- Las placas Petri se envolvieron en papel craft y se esterilizaron por calor seco en una estufa a 180°C por 2 horas.

- Las puntas para las micropipetas, los viales de vidrio y los tubos con tapa rosca se esterilizaron con calor húmedo en autoclave a 121°C y 15 lb/pg<sup>2</sup> durante 15 minutos.

##### **Preparación de los Medios de Cultivo**

Se preparó 10 mL de caldo TSB según las instrucciones del fabricante (30 gramos para 1 litro de agua destilada) en un tubo de ensayo y se esterilizó en autoclave.

Se preparó 50 mL de agar para la fase de activación según las instrucciones del fabricante (65 gramos para 1 litro de agua destilada) en un frasco de vidrio y se esterilizó en autoclave. El agar ya esterilizado se enfrió en baño María a 45-50°C y se vertió en placas Petri estériles.

Se preparó 200 mL de agar Sabouraud dextrosa para la fase analítica en un frasco de vidrio de acuerdo a las instrucciones del fabricante (65 gramos para 1 litro de agua destilada). Se autoclavó el agar a 121°C y 15 lb/pg<sup>2</sup> durante 15 minutos. Inmediatamente después de autoclavar se llevó a Baño María a 45 - 50°C. Una vez temperado se vertió el preparado fresco y tibio a placas Petri de vidrio estériles, para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm, esto corresponde a 25- 30 ml para placas de 90 mm de diámetro. El agar ya plaqueado se dejó solidificar a temperatura ambiente. El pH de cada lote de agar

Sabouraud dextrosa debe tener un pH entre 5,6-5,8. Esta medición puede realizarse sumergiendo el bulbo del electrodo del potenciómetro en el agar antes de autoclavar.

Se preparó 50mL de suero fisiológico estéril, para ello se pesó 900 mg de cloruro de sodio grado bacteriológico y se completó con agua destilada hasta un volumen de 10 mL, se esterilizó en autoclave. Luego se añadió volúmenes de 10 mL a un tubo estéril.

### **Activación de la Cepa**

La cepa se encontraba refrigerada entre 4-8°C en una placa con agar Sabouraud dextrosa.

Se tomó una colonia con el asa bacteriológica y se sembró en un tubo con caldo TSB, se dejó a una temperatura ambiente por 5 días.

La turbidez demostró el crecimiento de las cepas. Se sembró del caldo TSB a placas con agar Sabouraud dextrosa. Se dejó a temperatura ambiente.

### **Preparación de las Muestras**

Los extractos se trabajaron a 4 concentraciones: 100%, 75%, 50%, 25%.

100%: se colocó 2 mL del aceite en un vial de vidrio.

75%: se colocó 1.5 mL del extracto en un vial de vidrio y se añadió 0.5mL de DMSO.

50%: se colocó 1 mL del extracto en un vial de vidrio y se añadió 1mL de DMSO.

25%: se colocó 0.5 mL del extracto en un vial de vidrio y se añadió 1.5mL de DMSO.

## **II. Fase Analítica**

### **Preparación del Inóculo**

Desde las colonias puras del microorganismo *Aspergillus niger* se tomó una cantidad de colonias y se diluyó en un tubo de ensayo con 10 mL de suero fisiológico estéril (cloruro de sodio 0.9%) así que la solución resultante tuvo una turbidez correspondiente al tubo N°1 de la escala de MacFarland (escala turbidimétrica que consiste en una serie de tubos con turbidez creciente que permite hallar la concentración aproximada de una solución bacteriana) que corresponde a una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC /mL.

Desde esta última solución se realizó una dilución de 1 en 3, para ello de esta solución preparada se tomó 3 mL y se diluyó a un volumen total de 9 mL con suero fisiológico en un tubo con tapa rosca, todos los materiales usados deben ser estériles y también el área de trabajo. La solución resultante tuvo una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL.

### **Inoculación de las Placas**

Se agregó 100  $\mu$ L del inóculo bacteriano preparado ( $1 \times 10^8$  UFC /mL) a 6 placas con agar Sabouraud dextrosa para la cepa y con la ayuda de una espátula de Drigalsky se esparció el inóculo por todas la placas de tal manera que se obtenga un crecimiento homogéneo, para lo cual se deslizó el asa en la placa en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego se repitió el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más.

Deben asegurarse los cuidados en sembrar las placas de borde a borde, porque de lo contrario puede haber problemas en la realización de las lecturas. Se dejó secar 3 a 5 minutos antes de hacer los pocillos.

### **Formación de los pocillos**

- Se esterilizó el sacabocados con alcohol y se flameó en el mechero, luego con mucho cuidado se hizo los pocillos, se hizo tres por cada placa.

-Los pocillos deben estar a más de 15 mm del borde de la placa y deben distribuirse de tal manera que no haya superposición de los halos de inhibición.

### **Sembrado de las muestras y controles**

Se usó 4 placas para las diluciones del aceite, 1 placa por cada concentración.

Cada dilución se sembró por triplicado añadiendo 40uL en cada pocillo.

Como control negativo o muestra blanco se usó DMSO. En 1 placa se sembró 40uL por triplicado.

Como control positivo se usó una solución de Fluconazol equivalente a 25 µg/mL.

En 1 placa se sembró 40 µL por triplicado.

### **Incubación**

Las 6 placas de las diluciones de las muestras y los controles se colocaron a temperatura ambiente.

## **II. Fase Post analítica**

Después de 5 a 7 días de incubación, cada placa fue examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento bacteriano. Los diámetros de la zona de inhibición completa se midieron en milímetros pasando por el centro de cada pocillo. La medición se realizó por triplicado para cada pocillo con un vernier. Los resultados de las medidas por triplicado fueron promediados y se redondearon para reportarlo como un número natural.

### 3.8.6.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria Fungicida <sup>51</sup>

Para determinar la concentración mínima inhibitoria fungicida del aceite esencial extraído de la cáscara de los frutos frescos de *Citrus paradisi* Macfad, se utilizó el método de macrodilución en caldo, se procedió los siguientes pasos.

Se prepararon diluciones en tubos de ensayo conteniendo solución con la concentración de aceite esencial al 75%, 80%, 85%, 90% y 100%.

Seguidamente se colocaron en tubos 0,8 mL de cada concentración y 0,2 mL de los cultivos cada cepa de *Aspergillus niger* ATCC 16404 preparada respectivamente. De igual forma se prepararon los grupos control de fluconazol 0,8 mL y 0,2 mL de cada cepa. Y un control con el cultivo de cada cepa respectiva sin tratamiento, 1mL.

Luego todos los tubos se incubaron a una temperatura de 37°C durante un periodo de 48 horas. La determinación de la concentración fungicida, se realizó luego de 24 horas, empleando Agar Sabouraud Dextrosa para *Aspergillus niger*, tomando 0,1 mL de cada uno de los tubos y dispersándolo en toda la placa para determinar las Unidades Formadora de Colonias (UFC) utilizando el asa de Driglasky. Luego del sembrado todos los cultivos fueron llevados a incubación a 37°C durante 48 horas. Pasado las 48 horas se realizó el conteo de las colonias en cada una de las placas. La concentración fungicida es aquella en la que se inhibe totalmente el desarrollo de gérmenes.

## CAPITULO IV: RESULTADOS

### 4.1 Presentación de resultados

#### 4.1.1 Extracción del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad (Toronja")

A partir de 40 Kg de cáscara se obtuvo 25 mL de aceite esencial. Estos valores indican un rendimiento de 0,063 mL% v/p.

#### 4.1.2 Análisis preliminar y ensayos fisicoquímicos

**Tabla 2.** Análisis preliminar y ensayos fisicoquímicos del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad (toronja)

DETERMINACIONES	RESULTADOS
Análisis organoléptico	Líquido aromático, oleoso, volátil.
Miscibilidad	Inmiscible en agua y miscible en etanol absoluto y éter etílico.
Constantes físicas	pH: 5,4 Índice de refracción (21°C): 1,38 Gravedad específica (21°C): 0,844 g/mL

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.1. 3 Marcha fitoquímica del aceite esencial de toronja.

Los resultados de la marcha fitoquímica se exponen a continuación:

**Tabla 3: Análisis fitoquímico del aceite esencial de toronja.**

<b>METABOLITO</b>	<b>ESPECIFICACIONES</b>	<b>MÉTODO</b>	<b>RESULTADOS</b>
<b>ACEITES</b>	Reacción de dinitrofenilhidrazina	Cualitativo	+++
<b>GRASAS</b>	Reactivo de Sudan III	Cualitativo	-
<b>LACTONAS</b>	Reacción de Baljet	Cualitativo	-
<b>ALCALOIDE</b>	Reacción de Wagner	Cualitativo	++
	Reacción de Dragendorff	Cualitativo	++
<b>FLAVONOIDES</b>	Reacción de Shinoda	Cualitativo	++
<b>FENOLES</b>	Reacción de cloruro férrico	Cualitativo	+
<b>TRITERPENOS</b>	Reacción de Liebermann- Burchard	Cualitativo	+++
<b>CAROTENOS</b>	Reacción de Liebermann- Burchard	Cualitativo	+++

Leyenda: Muy positivo (+++), Positivo (++) , Poco positivo (+), negativo (-)

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 3, se observa que al realizar la marcha fitoquímica en el aceite esencial extraído de la cáscara de toronja, esta presenta reacción positiva a aceites, alcaloides, flavonoides, triterpenos y carotenos y reacción negativa a grasas y lactonas (anexo 10).

#### **4.1. 4 Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de toronja.**

Los resultados se resumen en la tabla a continuación:

**Tabla 4: Resultados de la Evaluación antifúngica del aceite esencial de toronja**

Microorganismo	Diámetro de inhibición (milímetros)					
	Control	Blanco	100%	75%	50%	25%
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	6	6	21	6	6	6
	6	6	21	6	6	6
	6	6	21	6	6	6
<b>Evaluación según la Escala de Duraffourd</b>	Nula (-)	Nula (-)	Sumamente sensible (+++)	Nula (-)	Nula (-)	Nula (-)

- El tamaño de los pocillos es de 6 mm, por lo tanto, cuando se reporta esta medida indica que no hay formación de halos de inhibición.
- Concentración de los inóculos:  $1 \times 10^8$  UFC/mL
- Control: Fluconazol 25 µg/mL

En la tabla 4, se observa los resultados del efecto inhibitorio en el crecimiento del aceite esencial extraído de la cáscara de toronja en *Aspergillus niger*, y según la escala de Duraffourd podemos decir que *Aspergillus niger* ATCC 16404 fue **sumamente sensible** a la concentración del 100% del aceite esencial, en esta concentración no se observó crecimiento del hongo y **nula** a las concentraciones del 75%, 50%, 25% del aceite esencial, no se observaron halos de inhibición (ver anexos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).



#### 4.1.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) Fungicida

**Tabla 5: Resultados de la CMI del aceite esencial de toronja frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404**

<b>TUBOS</b>	<b>Concentración porcentual del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Citrus paradisi</i> Macfad</b>	<b>Crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404</b>
1	100	-
2	95	-
3	90	+
4	85	+
5	80	+
6	75	+

Método: Macrodilución en caldo

Inóculo: *Aspergillus niger* 1x10<sup>8</sup> UFC/mL

Legenda:

- : No hubo crecimiento
- + : Si hubo crecimiento

En la tabla 5, nos muestra que el aceite esencial de la cáscara del fruto de toronja presenta una concentración mínima inhibitoria a la concentración del 95% frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404 (ver anexos 18, 19, 20, 21, 22, 23)

#### 4.2 Contrastación de hipótesis

##### Hipótesis alternativa

El aceite esencial extraído de la cáscara de los frutos frescos de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) posee metabolitos responsables de la actividad antifúngica *in vitro* frente a cepas de *Aspergillus niger* ATCC 16404.

### **Hipótesis Nula**

El aceite esencial extraído de la cáscara de los frutos frescos de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) no posee metabolitos responsables de la actividad antifúngica *in vitro* frente a cepas de *Aspergillus niger* ATCC 16404.

### **Hipótesis alternativa**

La concentración del aceite esencial de la cáscara de los frutos frescos de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) influye en la actividad antifúngica *in vitro* frente a cepas de *Aspergillus niger* ATCC 16404.

### **Hipótesis Nula**

La concentración del aceite esencial de la cáscara de los frutos frescos de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) no influye en la actividad antifúngica *in vitro* frente a cepas de *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Como se observa en la Tabla 4, el aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad presenta una concentración que presenta actividad antifúngica *in vitro* frente a cepas de *Aspergillus niger*, para considerar el nivel significativo se consideró que el ensayo se realizó por triplicado, se aplicó el anova de un solo factor utilizando el método de Tukey (anexo 24)

**Decisión:** se rechaza la hipótesis nula

La comprobación de la hipótesis general está dada en función de las contrastaciones realizadas con cada una de las hipótesis específicas. En consecuencia, al haberse encontrado significatividad en los resultados estadísticos del ANOVA y el test de Tukey, se infiere que el aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi* Macfad posee actividad antifúngica sobre *Aspergillus niger* ATCC 16404 (anexo 22).

### 4.3 Discusión de resultados

A partir de 40 Kg de cáscara de toronja se obtuvo 25 mL de aceite esencial. Estos valores indican un rendimiento de 0,063 mL% v/p. Este resultado puede considerarse para la extracción del aceite esencial de toronja con fines industriales, se debe indicar que los rendimientos por el método de hidrodestilación oscilan entre 0,01 hasta 0,5 mL aceite/Kg toronja <sup>52</sup>.

En el análisis del pH de los jugos de cítricos, según la especie de los frutos, se han reportado escalas de 2 para limones y hasta 5 para mandarinas, naranjas y toronjas <sup>53</sup>. El valor de la acidez obtenida en este estudio fue 5,4.

El índice de refracción obtenido fue 1,38 a 21°C, resultado inferior a lo reportado por Gunther (1973)<sup>52</sup> a 25 °C de 1,4755, según Pérez (2006)<sup>54</sup>, los aceites esenciales poseen un índice de refracción elevado, con un promedio de 1,5.

La gravedad específica obtenida del aceite esencial de la cáscara de toronja a 21°C de 0,844 g/mL, siendo similar a lo indicado por Gunther (1973) <sup>52</sup> de 0,858 g/mL y Pino et al. (1999) <sup>55</sup> de 0,8433.

En referencia a la marcha fitoquímica realizada al aceite esencial de toronja extraída de la cáscara del fruto fresco, este mostró reacciones positivas a aceites, alcaloides, flavonoides, fenoles, triterpenos y carotenos, con respecto a estos resultados se considera que estaría justificada la presencia de aceites, fenoles más no de alcaloides, flavonoides, triterpenos y carotenos considerando el método de extracción por arrastre de vapor y las propiedades físicas y químicas de los alcaloides, flavonoides, triterpenos y carotenos, estos no podrían ser extraídos pues poseen puntos de ebullición mayores al agua y un

alto peso molecular que dificultaría su extracción. Al respecto de los resultados falsos positivos que arroja la marcha fitoquímica que son pruebas cualitativas puede explicarse en el caso de la determinación de alcaloides con los reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorff estos pueden reaccionar con sustancias oxigenadas con alta densidad electrónica presente en el aceite esencial de toronja, en el caso de la determinación de flavonoides en la reacción de Shinoda, el hidrógeno nascente producto de la reacción del ácido y el zinc puede ser capturado por los componentes químicos presentes en el aceite esencial como los terpenos, los grupos carbonilos de los aceites, y finalmente para los compuestos triterpenos y carotenoides, el reactivo de Lieberman-Bouchard puede reaccionar con sustancias que presenten dienos conjugados en su estructura química como los hidrocarburos, terpenos presentes en el aceite esencial de toronja.

En la evaluación de la actividad antifúngica los resultados indican que el aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad inhibe el crecimiento del hongo a partir de una concentración del 95% frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404, este resultado es acorde a lo reportado por Viuda-Martos et al. (2008)<sup>10</sup> que indican que a una concentración de 0,94% del aceite esencial de toronja obtenido por presión en frío inhibe totalmente el crecimiento del hongo; por otro lado esto difiere a lo reportado por Rammanee y Hongpattarakere (2011)<sup>56</sup> quienes indican que el aceite esencial de *Citrus paradisi* obtenido por arrastre de vapor no posee actividad antifúngica sobre *Aspergillus niger*, y cabe mencionar que Okunowo et al. (2013)<sup>57</sup> reportó que el aceite esencial de *Citrus paradisi* obtenido por arrastre de vapor tampoco presenta actividad antifúngica sobre *Aspergillus niger*.

Del párrafo anterior, podemos indicar que posiblemente el método de extracción del aceite esencial influya en la actividad antifúngica porque con el método de prensado en frío se reporta que el aceite esencial de toronja a la concentración de 0,94% presenta actividad antifúngica sobre *Aspergillus niger*. Sin embargo, cuando se obtuvo el aceite esencial por el método con arrastre de vapor no mostró actividad antifúngica<sup>56,57</sup>. Cabe resaltar que los resultados de la presente investigación indican una actividad antifúngica sobre *Aspergillus niger* ATCC 16404 pero a concentraciones superiores del 95% del aceite esencial esto puede explicarse debido a la ausencia de flavonoides como por ejemplo naringina, neohesperidina, hesperidina, eriocitrina<sup>58</sup>, presentes en la cáscara del fruto de *Citrus paradisi* Macfad que en conjuntos los terpenos, aldehídos hacen sinergia para aumentar su actividad antifúngica sobre *Aspergillus niger*.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

El aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad “toronja” presenta actividad antifúngica a la concentración mínima inhibitoria del 95% para la cepa de *Aspergillus niger* ATCC 16404.

El aceite esencial extraído de la cascara de los frutos frescos de *citrus paradisi* Macfad. (toronja) posee metabolitos como los terpenos y fenoles responsables de la actividad antifúngica *in vitro* frente a cepas de *Aspergillus niger* ATCC16404.

## 5.2 Recomendaciones

Evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) frente a otros microorganismos de interés para la conservación de alimentos como alternativa de uso de conservantes.

Evaluar la actividad antifúngica de un extracto obtenido a partir de las cáscaras del fruto de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) frente a *Aspergillus niger*

Evaluar el uso del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad (toronja) en otras aplicaciones como en la industria alimentaria y la industria farmacéutica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Barrios MJ, Medina LM, Cordoba MG, Jordano R. Aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* isolated from cheese. J. Food Prot. 1997; 60: 192–194.
- 2 Amusa NA, Ashaye OA, Oladapo MO. Biodeterioration of the African star apple (*Chrysophyllum albidum*) in storage and the effect on its food value. Afr. J. Biotech. 2003; 2 (3): 56–59.
- 3 Joseph GS, Jayaprakasha GK, Selvi, AT, Jena BS, Sakariah KK. Antiaflatoxic and antioxidant activities of Garcinia extracts. Int. J. Food Microbiol. 2005; 101:153–160.
- 4 Castegnaro, M., & Wild, C. P. (1995). IARC activities in mycotoxin research. Natural Toxins. 1995; 3(4): 327-331.
- 5 Peraica MB, Radić A, Lucić M, Pavlović. Toxic effects of mycotoxins in humans. Bulletin of the World Health Organization. 1999; 77: 754-766
- 6 Bayman P, Baker JL. Ochratoxins: a global perspective. Mycopathologia. 2006;162 (3): 215-223.
- 7 Márquez O, Trigos A. Un peligro silencioso: Los venenos del quinto reino. En: Ramón Zulueta, Dora Trejo y Ángel Trigos (Eds.). El maravilloso mundo de los hongos. Universidad Veracruzana, Xalapa; 2007. pp. 141-150.
- 8 WHO. MICOTOXINAS [Internet]. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2018 [citado 8 septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>



- 9 Luna, M., Lozada, Y., & Trigos, Á. (2010). Aislamiento de cepas de *Aspergillus niger*, productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arabica*) almacenado. *Revista mexicana de micología*, 32, 63-68.
- 10 Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food control*.2008;19(12): 1130-1138.
- 11 Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163(3), 337-344.
- 12 Corcuera C.G. Efecto de la concentración del aceite esencial de *Citrus paradisi* L. sobre la viabilidad de *Candida albicans in vitro*. [Tesis para optar el título profesional de Biólogo]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2017.
- 13 Gómez C.K. Actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium* L.) frente al hongo (*Fusarium semitectum*). [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero industrial]. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2014
- 14 Gamboa J. Actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L." naranja" frente a la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*. [Tesis para optar el título profesional de Biólogo]. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2015.
- 15 Liu L, Xu X, Cheng D, Yao X, Pan S. Structure–activity relationship of citrus polymethoxylated flavones and their inhibitory effects on *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem*. 2012;60(17): 4336-4341.

- 16 Sharma N, Tripathi A. Fungitoxicidad del aceite esencial de *Citrus sinensis* en patógenos postcosecha. *Revista Mundial de Microbiología y Biotecnología*. 2006; 22(6): 587-593.
- 17 Bandoni A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento Industrial para la producción de aromas y sabores. Edit. Buenos Aires: UNLPCYTED; 2000.
- 18 Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol*. 2004; 94(3): 223-253.
- 19 Blázquez MA. Role of natural essential oils in sustainable agriculture and food preservation. *Journal of Scientific Research & Reports*. 2014; 3(14): 1843-1860.
- 20 Fisher K, Phillips CA. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *J Appl Microbiol*. 2006; 101(6): 1232-1240.
- 21 Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*. 2000; 88(2): 308-316.
- 22 Santamarina MP, Roselló J, Giménez S, Blázquez MA. Commercial *Laurus nobilis* L. and *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry essential oils against postharvested phytopathogenic fungi on rice. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*. 2015; 65: 325-332.

- 23 Gómez Molina Se. Micotoxinas. en Carrillo Leonor y Marcela Carina Audisio. Editores Manual de Microbiología de los Alimentos. 1a ed. - Jujuy; 2007. pp. 89-101.
- 24 Ortiz JM, Porras, I, Garcia Lidón A. El pomelo (*Citrus paradisi, Macf.*) y sus variedades. Levante Agrícola. 1987; 26(1): 30-32.
- 25 Swingle TS, Reece PC. The citrus Industry. Vol I: The botany of citrus and its wild relatives. Univ. Calif. Press, California; 1967. pp. 190-432.
- 26 Ortuño A, Baidez A, Gómez P. *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defense mechanism against *Penicillium digitatum*. Food Chem. 2006; 98: 351–358.
- 27 Calabro ML, Galtieri V, Cutroneo. Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in Citrus bergamia juice. J Pharm Biomed Anal. 2004; 35: 349–363.
- 28 Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry. 2000; 55: 481–504.
- 29 PromPerú. Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el turismo. Productos Agrícolas. Perú. 2009, p.17
- 30 Frisvad JC, Larsen TO, De Vries R, Meijer M, Houbraken J, Cabañes FJ, Samson RA. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. Studies in Mycology. 2007; 59: 31-37.

- 31 Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* 2004; 49: 201-241.
- 32 Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraeken JA, Frisvad JC, Varga J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in mycology.* 2007. 59: 129-145.
- 33 Samson RA, Houbraeken JAMP, Kuijpers AF, Frank JM, y Frisvad JC. Especies nuevas productoras de ocratoxina A o esclerocio en la sección *Nigri* de *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2004; 50: 45-61.
- 34 Esteban A, Abarca ML, Bragulat MR, Cabanes FJ. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Food Microbiology.* 2006; 23(7): 634-640.
- 35 Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JC, Samson, RA. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in mycology.* 2007; 59: 53-66.
- 36 Abarca ML. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17(3): S79-84.
- 37 Kuklinski C. Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega; 1999. 515 p.
- 38 Lock O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 3a ed. Lima: Pontificia universidad católica del Perú; 2016. 287 p.
- 39 Araneda X, Quilamán E, Martínez M, Morales D. Elaboración y evaluación de jugo de maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) por arrastre de vapor. *Scientia Agropecuaria.* 2014; 5(3):149-56.

- 40 Elmer W. Koneman et al "Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology" 6° Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- 41 Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. Microbiología Médica. 4ta. Edición Madrid, España: Editorial Mosby. 2002
- 42 Ambulidi M J. Identificación de dermatofitos presentes en uñas de pies mediante examen directo y cultivo micótico en agar sabouraud y agar papa en ganaderos del cantón celica. [Tesis de grado]. Loja – Ecuador: Facultad laboratorio clínico, universidad Nacional de Loja; 2015.
- 43 Villa GF. Composición química del aceite esencial de *Citrus paradisi* “Toronja”, actividad antioxidante y determinación de la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*. [Tesis de Post Grado]. Lima – Perú: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2017.
- 44 Günther E. The Essential Oils. Vol. 1: History and origin in Plants Production Analysis. Krieger Publishing: New York, USA, 1973.
- 45 DURAFFOURD, C. Iapraz J. *Fitoterapia Clínica*. Edit. Masson, 1983.
- 46 Cerpa MG. Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Valladolid, España, 2007.
- 47 A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemist. Official methods of Analysis. Arlington. V.A. 16th Edition. Washington. 2000. 1319p.
- 48 Domínguez. Aceites esenciales o aceites vegetales, Métodos de investigación Fitoquímica, Editorial Limusa, México. 1973. pág. 229-237

- 49 Cavalieri, Stephen, y col. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. [Internet]. Seattle, Washington; 2005 [citado el 27 enero 2017]. 242 p.
- 50 Davis y col. Effects of Commonly Used Topical Antimicrobial Agents on *Acinetobacter baumannii*: An In Vitro Study. *Military Medicine*, [Internet] 2008 [citado el 30 de enero 2017] 173, 1:74–78, disponible en: <http://militarymedicine.amsus.org>
- 51 Andrews MJ. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48 (Suppl 31): 5-16
- 52 Günther E. The Essential Oils. Vol. 1: History and origin in Plants Production Analysis. Krieger Publishing: New York, USA, 1973.
- 53 Agusti, M. Citricultura. 2da Edición. España. Editorial Aedos. p. 85-86, 2003.
- 54 Perez TF. Efectividad de los vapores de tomillo y orégano como agentes antibacterianos (Tesis de Maestría). Universidad de las Américas, Puebla, México, 2006.
- 55 Pino J, Acevedo A, Rabelo J, González C, Escandón J. Chemical Composition of Distilled Grapefruit Oil. *Journal essential Oil Research*. 1999; 11: 75-76.
- 56 RAMMANEE, Kadsarin; HONGPATTARAKERE, Tipparat. Effects of tropical citrus essential oils on growth, aflatoxin production, and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food and Bioprocess Technology*, 2011, vol. 4, no 6, p. 1050-1059.

- 57 Okunowo WO, Oyedeji O, Afolabi LO, Matanmi E. Essential oil of grape fruit (*Citrus paradisi*) peels and its antimicrobial activities. 2013.
- 58 De la Rosa-Hernández M, Wong-Paz JE, Muñiz-Márquez DB, Carrillo-Inungaray ML, Sánchez-González JM. (2016). Compuestos fenólicos bioactivos de la toronja (*Citrus paradisi*) y su importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2016; 47(2): 22-35.

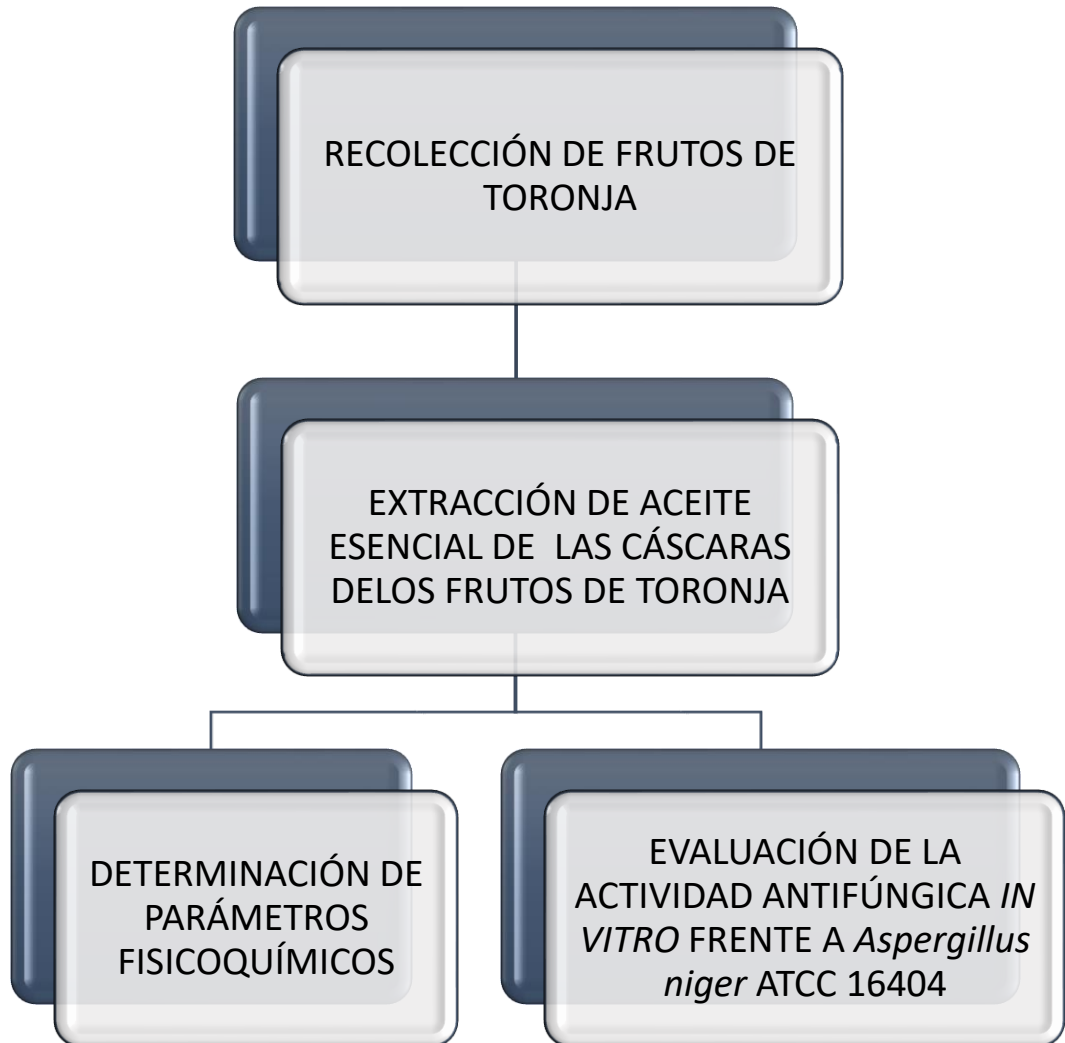
### Anexo 1: Matriz de Consistencia

Actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi* "Toronja" frente a *Aspergillus niger*

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	METODOLOGÍA	INSTRUMENTOS
¿El aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Citrus paradisi</i> Macfad (Toronja) posee actividad antifúngica <i>in vitro</i> frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404?	Evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial extraído a partir de la cáscara del fruto de <i>Citrus paradisi</i> Macfad (toronja) <i>in vitro</i> frente a <i>Aspergillus niger</i> 16404.	El aceite esencial extraído de la cáscara de los frutos frescos de <i>Citrus paradisi</i> Macfad (toronja) poseen actividad antifúngica <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404.	<p><b>Diseño:</b> Experimental</p> <p><b>Población Vegetal:</b> <i>Citrus paradisi</i> Macfad (toronja)</p> <p><b>Muestra vegetal:</b> Cáscaras del fruto de <i>Citrus paradisi</i> Macfad (toronja)</p> <p><b>Población microbiológica:</b> <i>Aspergillus niger</i> o <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404</p>	<p><b>TÉCNICA:</b> Observación</p> <p><b>INSTRUMENTO:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ficha de recolección de datos</li> <li>• Tablas y gráficos analizados por el programa estadístico Minitab ® 19</li> </ul>
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS		
¿Qué tipos de metabolitos presentes en el aceite esencial extraído a partir de la cáscara del fruto de <i>Citrus paradisi</i> Macfad (toronja) serían los posibles responsables de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404?	Determinar los tipos de metabolitos presentes en el aceite esencial extraído a partir de la cáscara del fruto de <i>Citrus paradisi</i> Macfad (toronja) y su posible relación antifúngica <i>in vitro</i> frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404.	El aceite esencial extraído de la cáscara de los frutos frescos de <i>Citrus paradisi</i> Macfad (toronja) posee metabolitos responsables de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404.		
¿la concentración del aceite esencial extraído de la cáscara de <i>Citrus paradisi</i> Macfad (Toronja) influirá en la actividad antifúngica <i>in vitro</i> frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404?	Determinar la concentración del aceite esencial de la cáscara de <i>Citrus paradisi</i> (toronja) con actividad antifúngica <i>in vitro</i> frente a <i>Aspergillus niger</i> 16404.	La concentración del aceite esencial extraído de la cáscara de los frutos frescos de <i>Citrus paradisi</i> Macfad (toronja) influye en la actividad antifúngica <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404.		



## ANEXO 2: DISEÑO DEL ESTUDIO



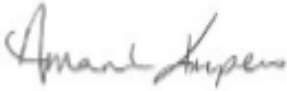
### ANEXO 3: Cepa de *Aspergillus niger*



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p><b>Specifications</b>  <b>Microorganism Name:</b> <i>Aspergillus brasiliensis</i>  <b>Catalog Number:</b> 0392  <b>Lot Number:</b> 392-880**  <b>Reference Number:</b> ATCC® 16404™*  <b>Purity:</b> Pure  <b>Passage from Reference:</b> 2</p>	<p><b>Expiration Date:</b> 2020/8/31  <b>Release Information:</b>  <b>Quality Control Technologist:</b> Carol J Stanoch  <b>Release Date:</b> 2018/9/18</p>
--	---

<b>Performance</b>	
<p><b>Macroscopic Features:</b>  Rapidly growing colonies which are initially white or pale yellow, quickly become black with conidia (spore) production. Reverse is pale yellow.</p> <p><b>Microscopic Features:</b>  Chains of small conidia which arise from short sterigmata arranged radially over the surface of the vesicle</p>	<p><b>Medium:</b>  PDA</p> <p><b>Method:</b>  Lactophenol Blue (1)</p>

<p><b>ID System:</b> MALDI-TOF (1)  See attached ID System results document.</p>	 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
--	--

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

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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



(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2006.

## Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



### Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

### Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	<b>High consistency:</b> The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	<b>Low consistency:</b> The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	<b>No consistency:</b> The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Aspergillus brasiliensis  
 Sample Description: 0392  
 Sample ID: 392-000  
 Sample Creation Date/Time: 2018-09-14T07:53:55.033 cjs  
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
D6 (+++)(B)	392-000	Aspergillus brasiliensis	2.13

Comments:

n/a



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



## CONSTANCIA

AUTENTICIDAD DE CEPAS DE *Aspergillus niger* o *Aspergillus brasiliensis*


*EL DIRECTOR DEL CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA A LOS BACHILLERES:*

**Bach. Vilchez Torres, Rosario del Pilar y  
Bach. Alayo Deza, Jessica**

Que en la realización de trabajo de tesis "*Actividad antifúngica in vitro del aceite esencial de la cáscara de Citrus paradisi Macfad (Toronja) frente a Aspergillus niger*" utilizaron cepas de *Aspergillus niger* o *Aspergillus brasiliensis* de lote 392-880 y con número de referencia : ATCC 16404 del área de Microbiología del Centro de Control Analítico.

Se expide el presente documento a solicitud de las interesadas, para los fines de sustentación.

Lima, 02 de Diciembre del 2019

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



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

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

ISO 9001

BUREAU VERITAS  
Certification

N° BR233265



## ANEXO 4 : FICHA DE OBSERVACION DE ANALISIS FITOQUIMICO



Instrumento de Recolección de datos

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE SCREENING FITOQUÍMICO

Actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de la cáscara de *Citrus ~~parviflora~~* "Toronja"

frontera a *Aspergillus ~~sp.~~*

### INSTRUCCIONES

- ✓ Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.
- ✓ Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.
- ✓ Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.
- ✓ En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, desarte su evaluación.
- ✓ Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.
- ✓ Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea

METABOLITO	ESPECIFICACIONES	METODO	RESULTADOS
GRASAS	Sudan III	Cualitativo	
CUMARINAS	Hidróxido de sodio	Cualitativo	
LACTONAS	Reacción de <del>Beilstein</del>	Cualitativo	
ALCALOIDES	Reacción de Wagner	Cualitativo	
	Reacción de <del>Dragendorff</del>	Cualitativo	
FLAVONOIDES	Reacción de <del>Shroeder</del>	Cualitativo	
FENOLES	Reacción de cloruro férrico	Cualitativo	
TRITERPENOS	Reacción de Liebermann- Buchard	Cualitativo	
	Reacción de Liebermann- Buchard	Cualitativo	

Leyenda: (++) Moderado, (+++) Abundante, (-) Ausente

## ANEXO 5: FICHA DE OBSERVACIÓN DE EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA



Instrumento de Recolección de datos

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE EVALUACION ANTIFUNGICA

Actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi* "Toronja"

frente a *Aspergillus niger*

### INSTRUCCIONES

- ✓ Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.
- ✓ Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.
- ✓ Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.
- ✓ En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.
- ✓ Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.
- ✓ Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea

### EFFECTO ANTIFUNGICO CONTRA *Aspergillus niger* ATCC POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCOS

N° DE PLACA	CONCENTRACIÓN(%) DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CÁSCARA DE <i>Citrus paradisi</i> "Toronja"			CONTROLES	
				Fluconazol µg	Etanol 96°
	LONGITUD DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)				
	25%	50%	100%	6 µg	100µl



## ANEXO 6:

### FORMATO DE OPINION DE EXPERTOS

Anexo N° : Juicio de expertos

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA  
HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi* frente a  
*Aspergillus niger*

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

ITEM	PREGUNTA	MENOS DE					
		50	60	70	80	90	100
1.	¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?						✓
2.	¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?						✓
3.	¿Qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?						✓
4.	¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?						✓
5.	¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?						✓
6.	¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrían datos similares si se aplicara a otras muestras?						✓

#### SUGERENCIAS

1. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

.....  
.....

2. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

.....  
.....

3. ¿Qué ítems estima que deberán reformularse o procesarse mejor?

.....  
.....  
.....

Fecha : 11.04.2019

Validado por: Q.F. Mg. Guillerma Fernanda Villa Gonzales

Firma: 

C.P.P 09105

**ANEXO 7:**

**FORMATO DE OPINION EXPERTOS**

Anexo N° : Juicio de expertos

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA  
HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi* frente a  
*Aspergillus niger*

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

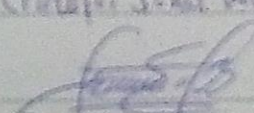
ITEM	PREGUNTA	MENOS DE					
		50	60	70	80	90	100
1.	¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?						✓
2.	¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?						✓
3.	¿Qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?						✓
4.	¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?						✓
5.	¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una estructura lógica?						✓
6.	¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se aplicara a otras muestras?						✓


**SUGERENCIAS**

- ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?  
.....
- ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?  
.....
- ¿Qué ítems estima que deberán reformularse o procesarse mejor?  
*Ninguno*

Fecha: 10.04.2019

Validado por: O.F. Cristófer Johel Bellido Acha

Firma: 

  
Cristófer Johel Bellido Acha  
QUÍMICO FARMACÉUTICO  
C.Q.R. 14813



## ANEXO 8:

### CONSTANCIA DE CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

PROFESORADO DE POST GRADO, INGENIERÍA DE ALIMENTOS  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

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

**CONSTANCIA N° 129-USM-2019**

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

La muestra vegetal (frutos) recibida de **Rosario del Pilar Vilchez Torres y Jessica Alayo Deza**, estudiante de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, ha sido estudiada y clasificada como: ***Citrus paradisi Macfad*** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

**DIVISION:** MAGNOLIOPHYTA

**CLASE:** MAGNOLIOPSIDA

**SUB CLASE:** ROSIDAE

**ORDEN:** SAPINDALES

**FAMILIA:** RUTACEAE

**GENERO:** *Citrus*

**ESPECIE:** *Citrus paradisi Macfad*

Nombre vulgar: "Toronja"  
Determinada por: Mag. Asunción A. Cano Echevarría

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

Lima, 06 de mayo de 2019

 Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA  
JEFE JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb

**ANEXO 9:**


**EQUIPO DE DESTILACION PARA OBTENER ACEITES ESENCIALES**




**MÉTODO POR ARRASTRE DE VAPOR**

## ANEXO 10:

### PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE FITOQUIMICO



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




### PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00438-CPF-2019


ORDEN DE ANÁLISIS	: 005541/2019
SOLICITADO POR	: JESSICA ALAYO DEZA Y ROSARIO DEL PILAR VILCHEZ TORRES
MUESTRA	: ACEITE ESENCIAL DE LA CÁSCARA DE TORONJA
LOTE	: —
CANTIDAD	: 01 frasco x 2mL, aprox.
FECHA DE RECEPCIÓN	: 12 de Noviembre del 2019
FECHA DE FABRICACION	: —
FECHA DE VENCIMIENTO	: —

METABOLITO	ESPECIFICACIONES	MÉTODO	RESULTADOS
ACEITE	Reacción de Dinitrofenilhidrazina	Cualitativo	+++
GRASAS	Sudan III	Cualitativo	-
LACTONAS	Reacción de Hidróxido de Sodio	Cualitativo	-
ALCALOIDES	Reacción de Dragendorff	Cualitativo	++
	Reacción de Wagner	Cualitativo	++
	Reacción de Mayer	Cualitativo	++
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	Cualitativo	++
FENOLES	Reacción de Cloruro Férrico	Cualitativo	+
TRITERPENOS	Reacción de Liebermann - Burchard	Cualitativo	+++
ESTEROLES	Reacción de Liebermann - Burchard	Cualitativo	+++
CAROTENOS	Reacción de Liebermann - Burchard	Cualitativo	+++



Lima, 21 de Noviembre del 2019



**QF. Gustavo Guerra Brizuela**  
Director del Centro de Control Analítico



**\*FARMACIAS LA PROPIEDAD DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO\***  
 Jr. Puro N° 1002 Jardín Botánico - Lima 1 - Perú  
 ☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ☒ Ap. Postal 4539 - Lima 1  
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe http://farmacia.unmsm.edu.pe

## ANEXO 11:

### PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA



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



#### PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00163-CPF-2019

ORDEN DE ANÁLISIS : 005342/2019  
SOLICITADO POR : JESSICA ALAYO DEZA Y ROSARIO DEL PILAR VILCHEZ TORRES  
MUESTRA : ACEITE ESCENCIAL DE LA CÁSCARA DE TORONJA  
LOTE : —  
CANTIDAD : 01 frasco x 5 mL. Aprox.  
FECHA DE RECEPCIÓN : 07 de Mayo del 2019  
FECHA DE FABRICACION : —  
FECHA DE VENCIMIENTO : —

Microorganismo	Diámetros de inhibición en milímetros					
	Control	Blanco	100%	75%	50%	25%
<i>Aspergillus niger</i>	6	6	Inhibición completa	6	6	6
	6	6	Inhibición completa	6	6	6
	6	6	Inhibición completa	6	6	6

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

\*Concentración de los inóculos:  $1 \times 10^8$  UFC/mL.

\*Control: Fluconazol 25 ug/mL.

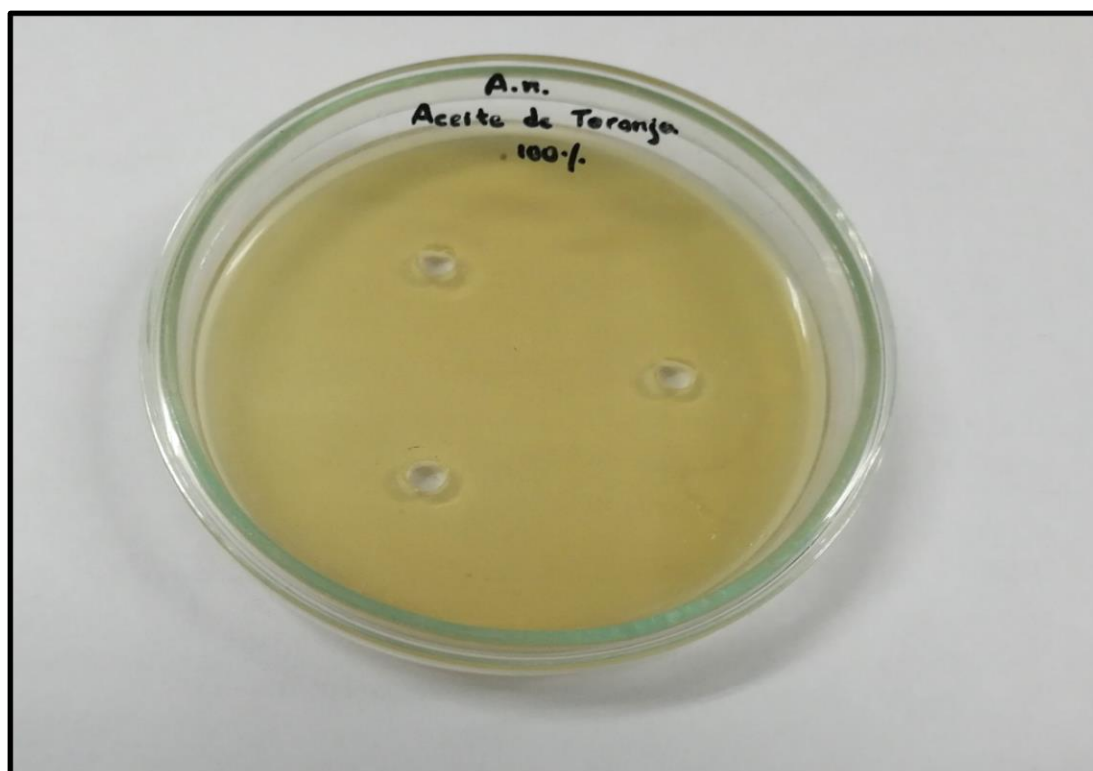
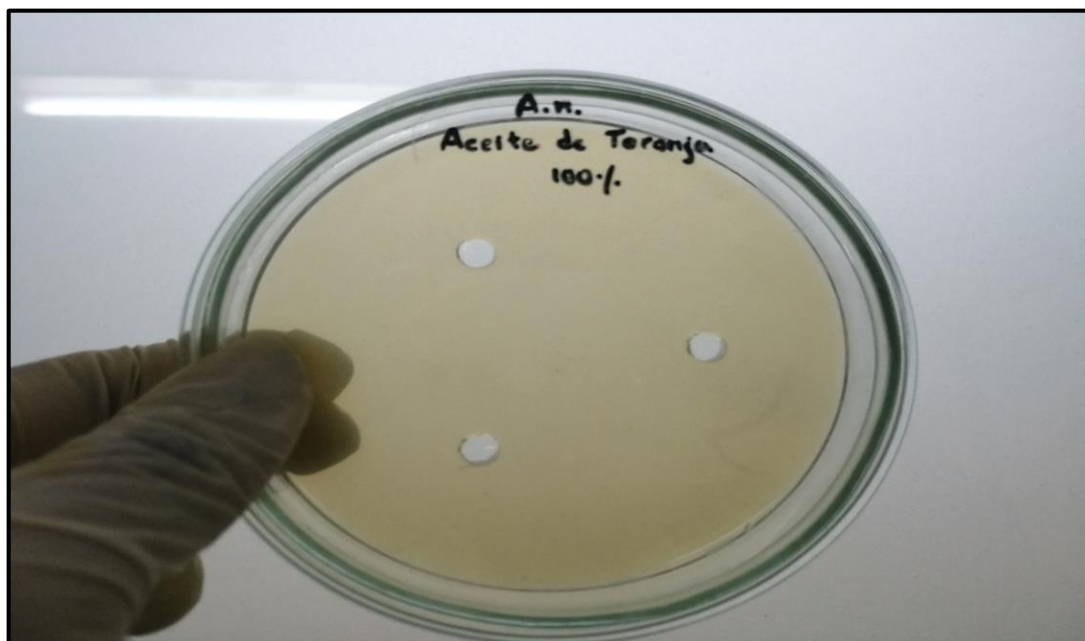
Lima, 21 de Mayo del 2019

QF. Gustavo Guerra Brizuela  
Director del Centro de Control Analítico



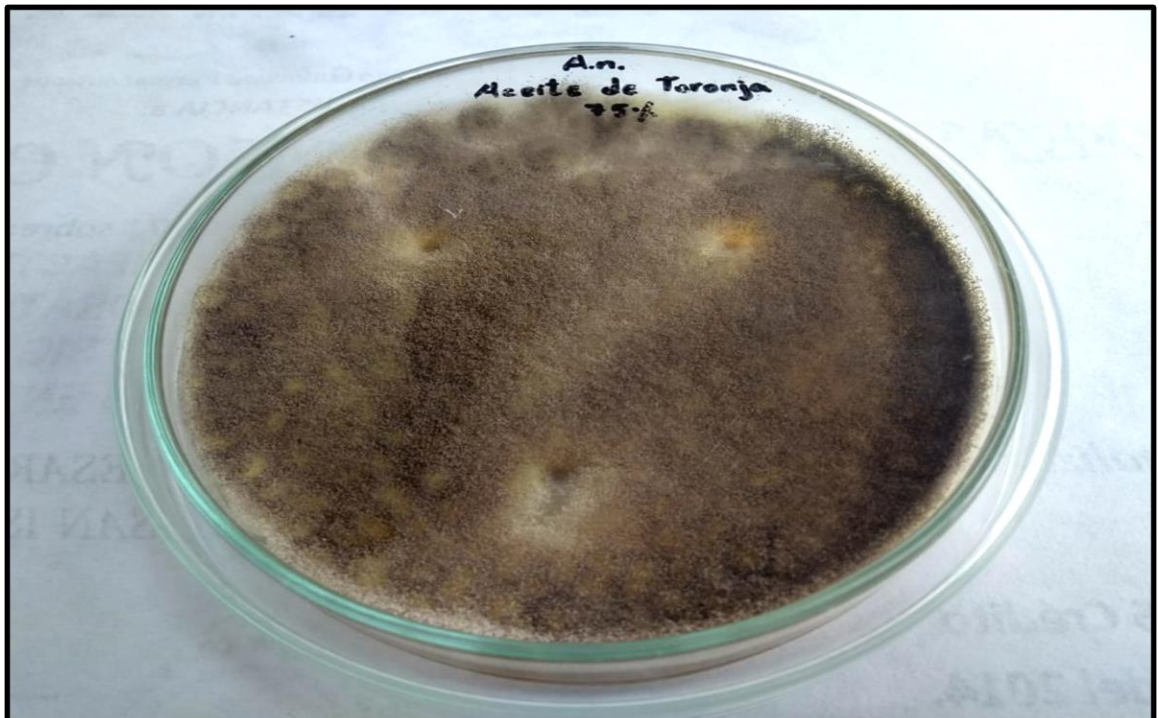


**ANEXO 12:**  
**FOTOS DE EVALUACION ANTIFUNGICA DE ACEITE ESENCIAL**  
**DE LA CASCARA DE FRUTOS DE TORONJA 100%**



**ANEXO 13:**

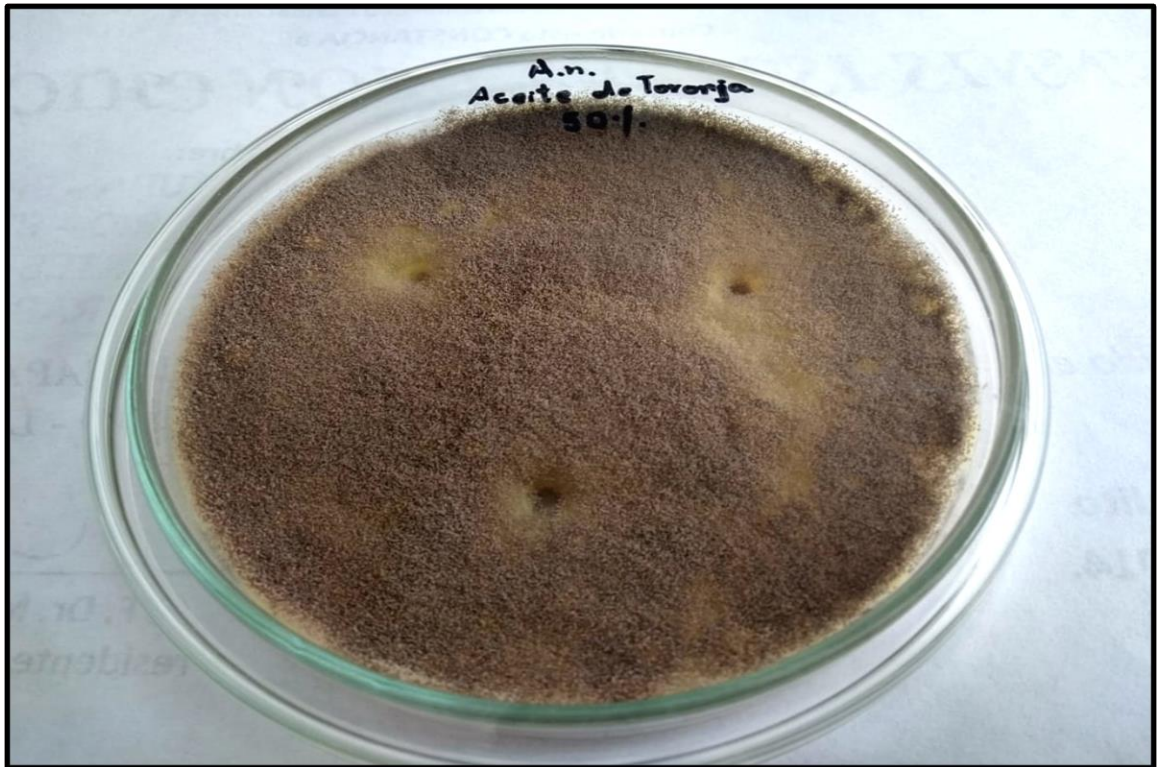
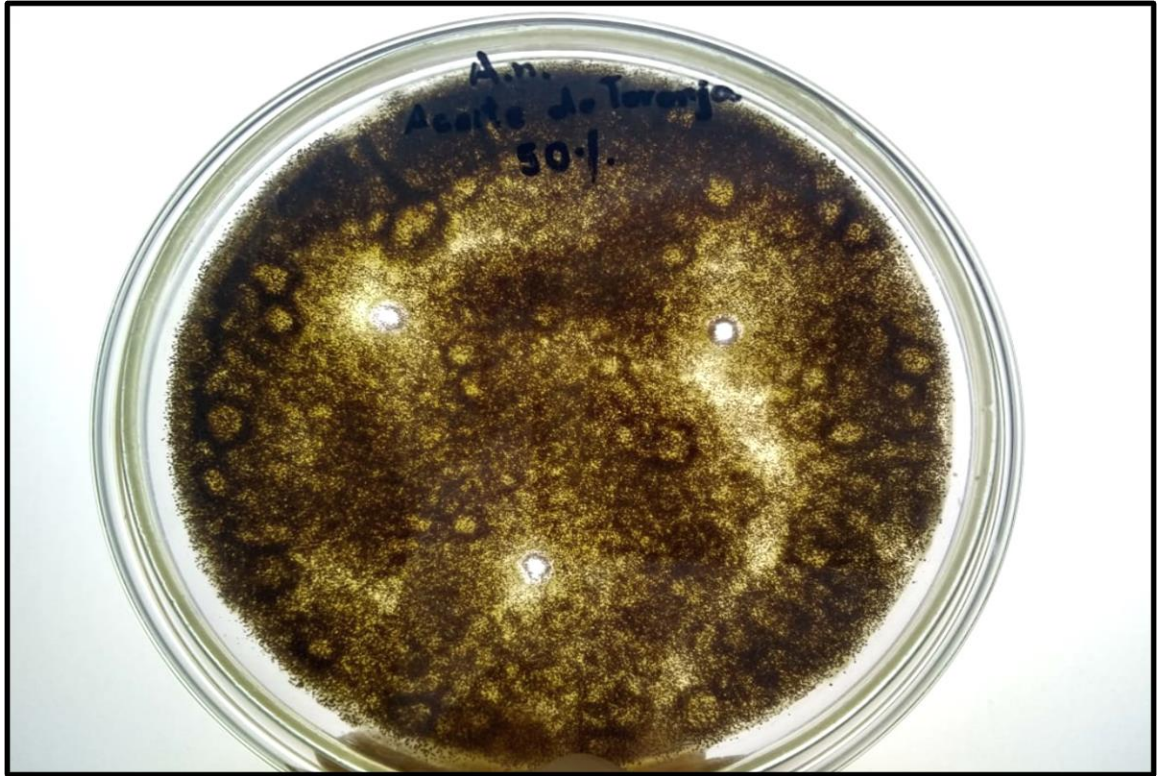
**FOTOS DE EVALUACION ANTIFUNGICA DE ACEITE ESENCIAL  
DE LA CASCARA DE FRUTOS DE TORONJA AL 75 %**





**ANEXO 14:**

**FOTOS DE EVALUACION ANTIFUNGICA DE ACEITE ESENCIAL  
DE LA CASCARA DE FRUTOS DE TORONJA AL 50 %**



**ANEXO 15:**

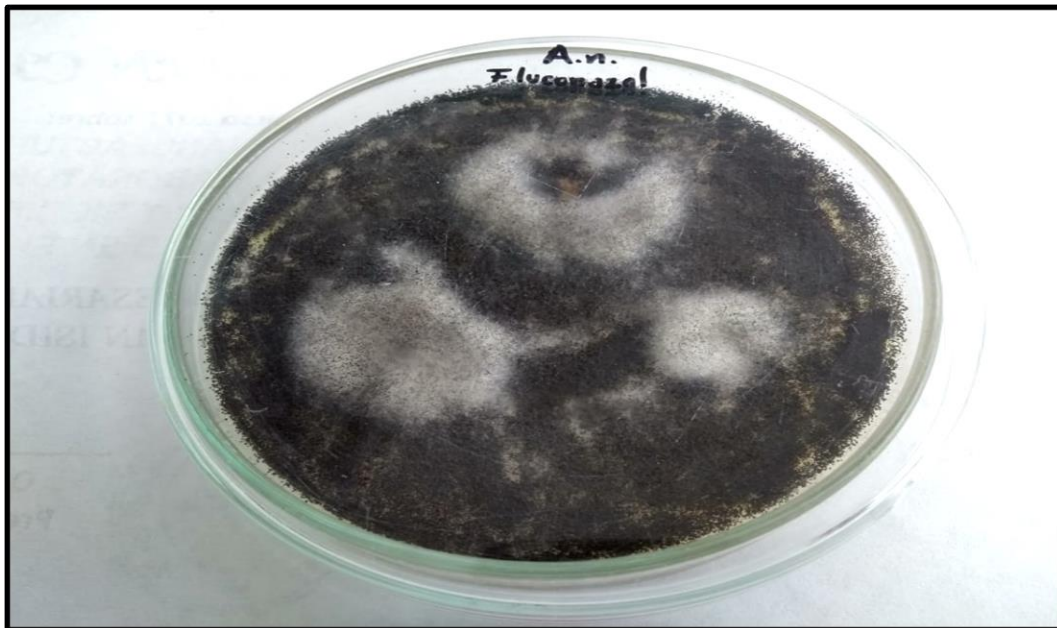
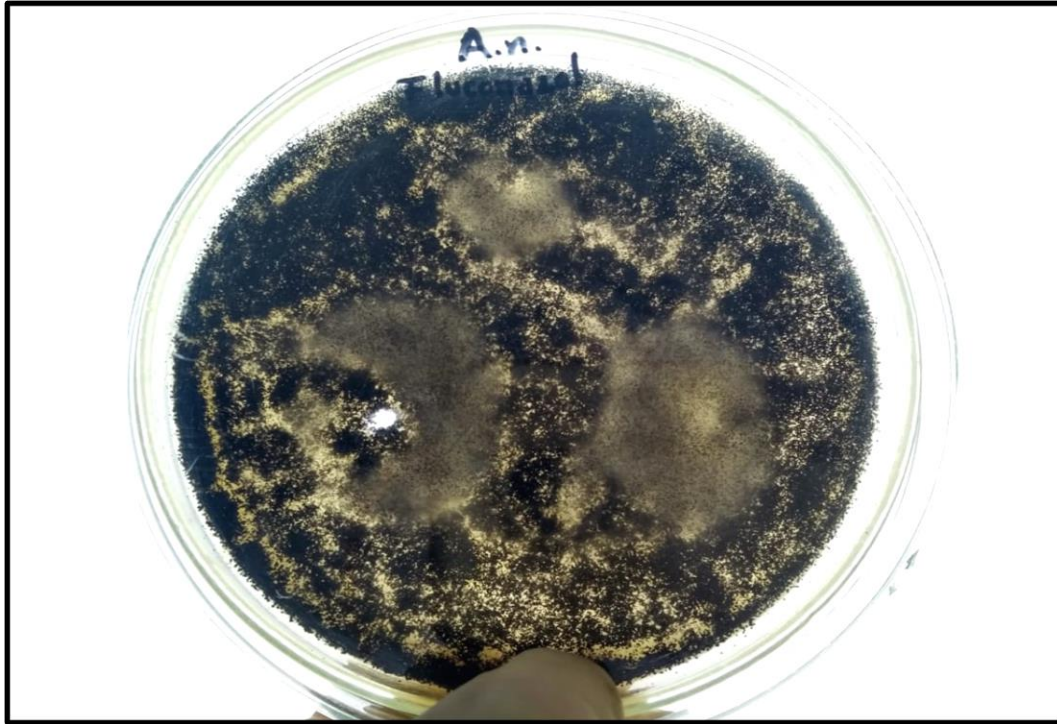
**FOTOS DE EVALUACION ANTIFUNGICA DE ACEITE ESENCIAL  
DE LA CASCARA DE FRUTOS DE TORONJA AL 25 %**





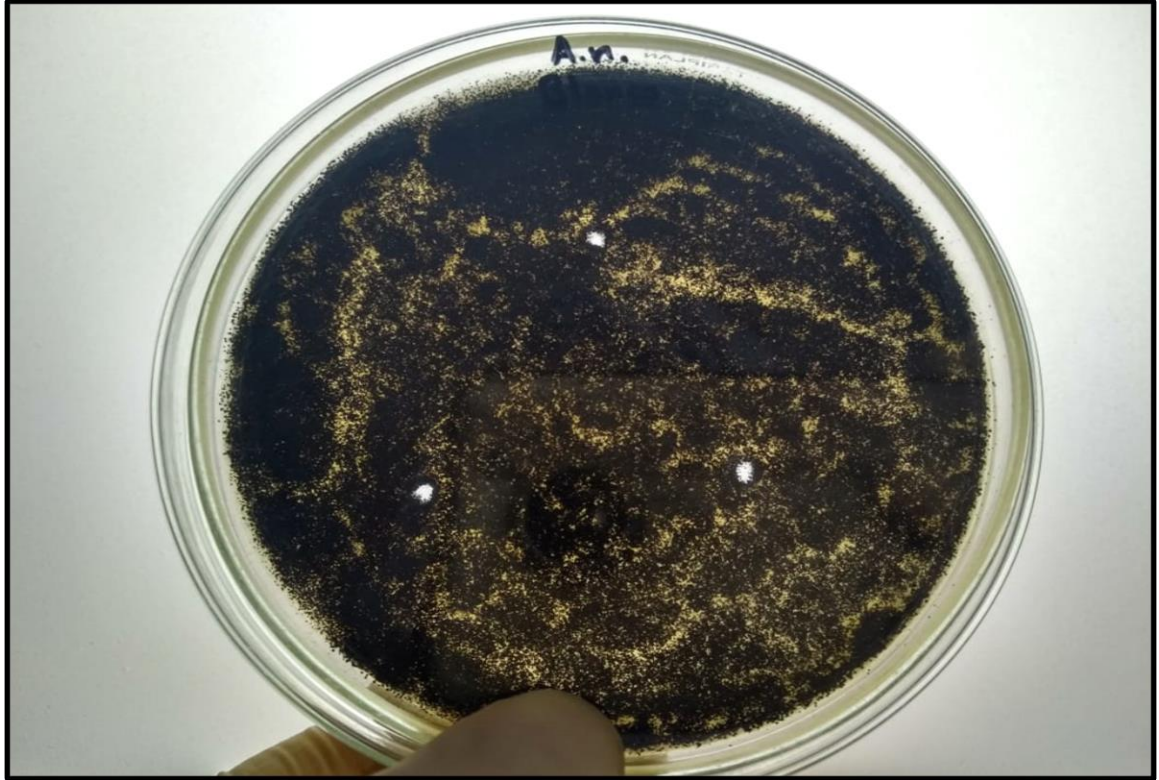
**ANEXO 16:**

**FOTOS DE EVALUACION ANTIFUNGICA DEL CONTROL POSITIVO**



**ANEXO 17:**

**FOTOS DE EVALUACION ANTIFUNGICA DEL CONTROL NEGATIVO**





## ANEXO 18:

Protocolo de análisis para determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404



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



### PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00427-CPF-2019

ORDEN DE ANÁLISIS : 005541/2019  
SOLICITADO POR : ROSARIO DEL PILAR VILCHEZ TORRES  
MUESTRA : ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LA CÁSCARA DE TORONJA  
NÚMERO DE LOTE : ----  
CANTIDAD : 01 frasco x 5 mL aprox.  
FECHA DE RECEPCIÓN : 05 de Noviembre del 2019  
FECHA DE FABRICACIÓN : ----  
FECHA DE VENCIMIENTO : ----

TUBOS	CONCENTACIÓN	RESULTADO
1	100%	-
2	95%	-
3	90%	+
4	85%	+
5	80%	+
6	75%	+

Método: Macrodilución en caldo  
Inóculo: *Aspergillus niger* 1x10<sup>8</sup> UFC/MI

Leyenda:

- : No hubo crecimiento
- + : Si hubo crecimiento

Conclusión:

La muestra de Aceite Esencial de la Cáscara de Toronja presenta una concentración mínima inhibitoria de 95% contra *Aspergillus niger* mediante la técnica de macrodilución en caldo

Lima, 18 de Noviembre del 2019

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



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

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

ISO 9001

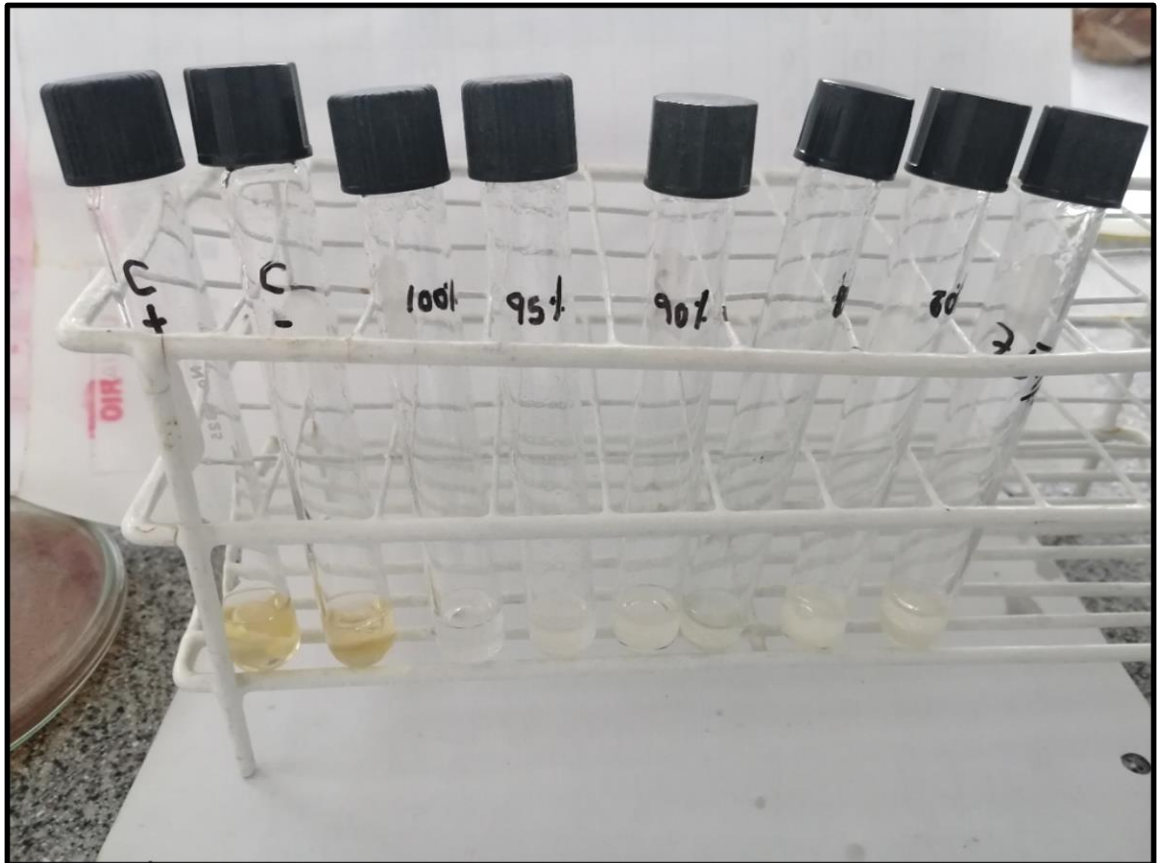
BUREAU VERITAS  
Certification

N° BR23250



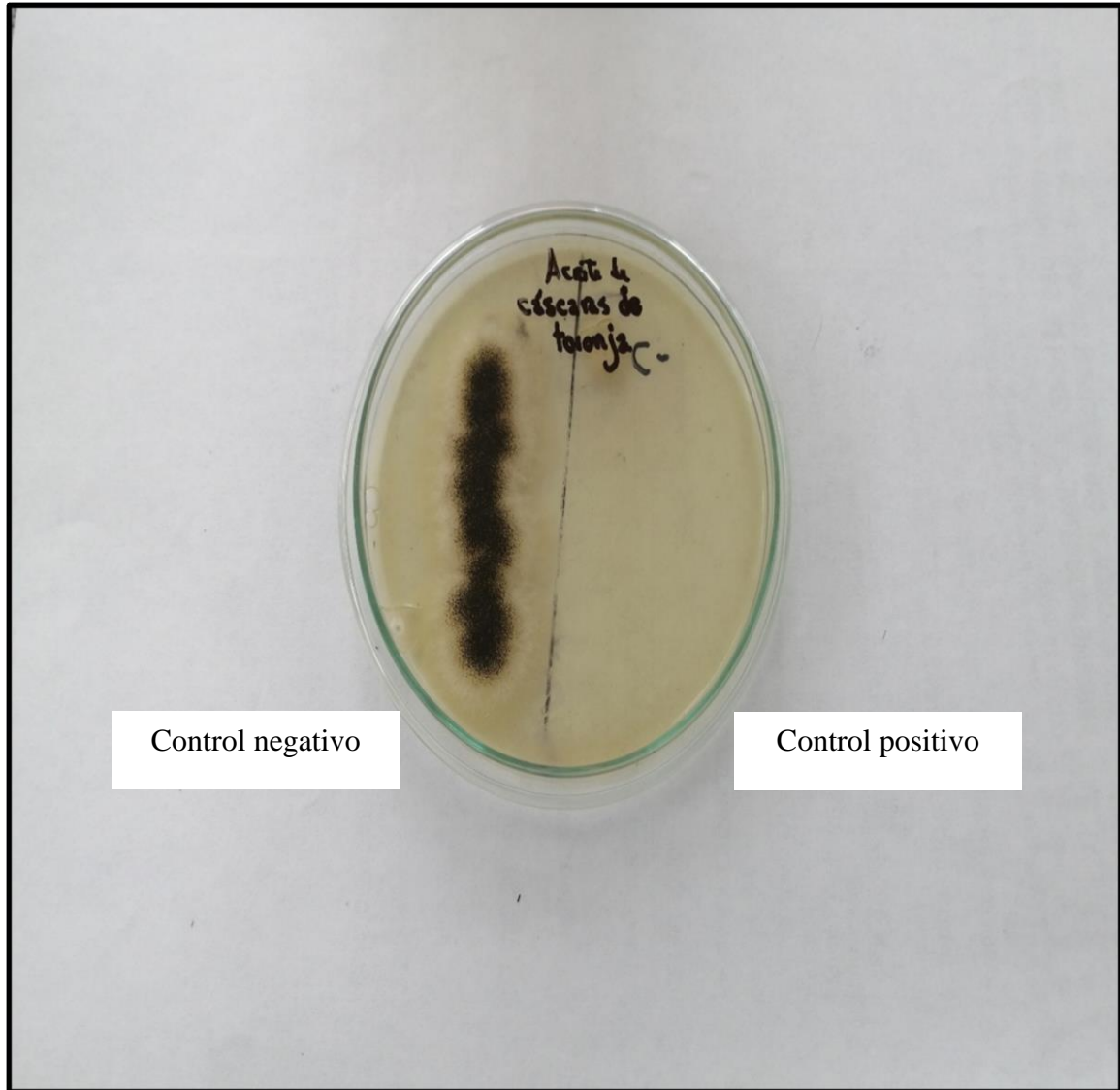
### ANEXO 19:

Fotos para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404



## ANEXO 20:

Fotos de Control positivo (fluconazol) y negativo para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404.



## ANEXO 21:

Fotos para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad a concentraciones de 75% y 80% frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404.





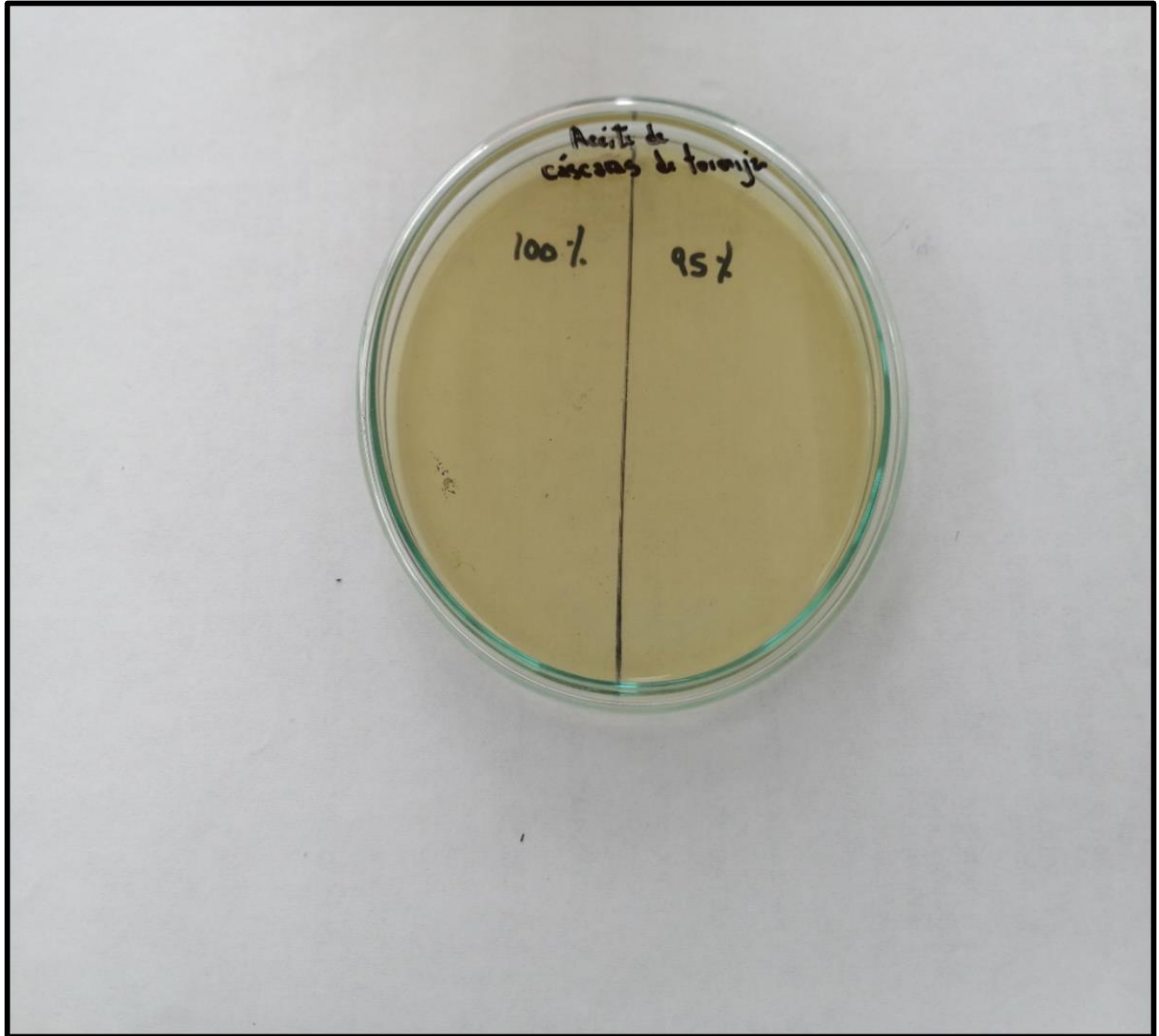
## ANEXO 22:

Fotos para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad a concentraciones de 85% y 90% frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404.



### ANEXO 23:

Fotos para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Citrus paradisi* Macfad a concentraciones de 95% y 100% frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404.





## ANEXO 24:

### Resultados del análisis estadístico de ANOVA de un solo factor: 25; 50; 75; 100

#### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

#### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	25; 50; 75; 100

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	491.583	163.861	983.17	0.000
Error	8	1.333	0.167		
Total	11	492.917			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.408248	99.73%	99.63%	99.39%

#### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
25	3	6.000	0.000	(5.456; 6.544)
50	3	6.333	0.577	(5.790; 6.877)
75	3	6.333	0.577	(5.790; 6.877)
100	3	21.00	0.00	(20.46; 21.54)

Desv.Est. agrupada = 0.408248

#### Comparaciones en parejas de Tukey

#### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
100	3	21.00	A
75	3	6.333	B
50	3	6.333	B
25	3	6.000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

#### Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
50 - 25	0.333	0.333	(-0.734; 1.401)	1.00	0.754
75 - 25	0.333	0.333	(-0.734; 1.401)	1.00	0.754
100 - 25	15.000	0.333	(13.932; 16.068)	45.00	0.000

75 - 50	0.000	0.333 (-1.068; 1.068)	0.00	1.000
100 - 50	14.667	0.333 (13.599; 15.734)	44.00	0.000
100 - 75	14.667	0.333 (13.599; 15.734)	44.00	0.000

Nivel de confianza individual = 98.74%

