

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**“Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de  
cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*) y su incorporación en  
formulaciones farmacéuticas”**

**INFORME DE TESIS**

**Presentado por**

**María Isabel Ponce Ayala**

**Para optar al título de  
Química Farmacéutica**

**Guatemala marzo, 2017**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or historical figure, surrounded by various symbols including a crown, a lion, and a cross. The Latin motto "CETERAS ORBS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

**“Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de  
cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*) y su incorporación en  
formulaciones farmacéuticas”**

**María Isabel Ponce Ayala**

**Química Farmacéutica**

**Guatemala marzo, 2017**

## **JUNTA DIRECTIVA**

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreína Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

## AGRADECIMIENTOS

**A Dios**, por el regalo de la vida, por darme la oportunidad de formarme como profesional en esta casa de estudios.

**A mis padres**, por motivarme a alcanzar todas mis metas y ser ejemplo de enseñanza y buenos valores.

**A mis hermanos**, por ser mis amigos y apoyarme en todo momento.

**A mi novio**, por su apoyo y cariño incondicional.

**A mi asesor**, el licenciado Julio Chinchilla, por su tiempo y su apoyo para la realización de este trabajo.

**A mi revisora**, la licenciada Lucrecia Peralta de Madriz, por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

**A mis amigos**, por su motivación, por los buenos momentos y los recuerdos compartidos.

**A la Universidad de San Carlos de Guatemala**, por ser mi casa de estudios y por darme la maravillosa oportunidad de formarme como profesional al servicio de este país.

**A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**, por acogerme durante mi etapa como estudiante y mi breve paso como docente por sus aulas.

*Agradezco de manera especial a la escuela de Química Biológica, sobre todo al departamento de Bioquímica por acogerme, ensañarme y apoyarme durante la realización de este trabajo de tesis.*

## **DEDICATORIA**

A Dios, por el milagro de la vida, por permitirme ser una mujer profesional.

A mis padres Héctor y Julieta, por apoyarme para lograr mis metas y sueños, por enseñarme a ser una persona con valores y principios, por aconsejarme y mostrarme el valor de la vida.

A mi hermano Héctor, por enseñarme el valor de la fortaleza y la lucha constante.

A mi hermana Gabriela, por su optimismo y fe inquebrantables.

A mi hermana Ana María, por su inocencia, alegría y cariño especial.

A mis tías, tíos y primos, por su apoyo, cariño y consejos.

A mis abuelos, por la sabiduría y por enseñarme el valor del trabajo.

A mi novio Victor, por ser mi mejor amigo, por compartir nuestros sueños, por el cariño y por motivarme y escucharme incondicionalmente.

A mis amigos, por los buenos momentos y las memorias.

A la memoria de quienes ya no están: Rosana Ayala, Andrés Ayala, Jovelina Guillén, Julio Ramos y Oscar Larios, para que nunca sean olvidados y su recuerdo me acompañe siempre.

## ÍNDICE

<b>1. Resumen</b>	3
<b>2. Introducción</b>	4
<b>3. Antecedentes</b>	6
3.1 Propiedades de los aceites esenciales del género <i>Citrus</i>	6
4.1.1 Propiedades antibacterianas y antifúngicas de la toronja	7
3.2 Uso de aceites esenciales en la industria	8
3.3 Uso de antimicrobianos sintéticos en la industria	9
<b>4. Justificación</b>	11
<b>5. Objetivos</b>	12
5.1 Objetivo General	12
5.2 Objetivos Específicos	12
<b>6. Hipótesis</b>	13
<b>7. Materiales y Métodos</b>	14
7.1 Universo de trabajo	14
7.1.1 Muestra	14
7.2 Materiales	14
7.2.1 Recurso humano	14
7.2.2 Recursos materiales	14
7.2.3 Productos biológicos	14
7.3 Métodos	15
7.3.1 Determinación de Limoneno en aceite esencial de cáscara de toronja ( <i>Citrus paradisi L.</i> ) mediante cromatografía de gases.	15
7.3.2 Determinación <i>in vitro</i> de actividad antimicrobiana del aceite esencial de toronja ( <i>Citrus paradisi L.</i> )	15
7.3.3 Formulación de productos farmacéuticos	16
7.3.4 Ensayo de estabilidad acelerada para productos farmacéuticos	16
7.3.5 Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de cáscara de toronja ( <i>Citrus paradisi L.</i> ) posterior a su incorporación en formulaciones farmacéuticas	17
7.4 Análisis Estadístico	17
<b>8. Resultados</b>	18
8.1 Determinación de limoneno en aceite esencial de cáscara de toronja ( <i>Citrus paradisi L.</i> ) mediante cromatografía de gases-masas	18
8.2 Determinación <i>in vitro</i> de actividad antimicrobiana del aceite esencial de cáscara de toronja ( <i>Citrus paradisi L.</i> )	19
8.3 Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de cáscara de toronja ( <i>Citrus paradisi L.</i> ) posterior a su incorporación en formulaciones farmacéuticas	20
<b>9. Discusión</b>	21
<b>10. Conclusiones</b>	24
<b>11. Recomendaciones</b>	25

<b>12.Referencias</b>	26
<b>13.Anexos</b>	31
Anexo No.1	31
Anexo No.2	39
Anexo No.3	39
Anexo No.4	40
Anexo No.5	40
Anexo No.6	41
Anexo No.7	43
Anexo No.8	45
Anexo No.9	46
Anexo No.10	47
Anexo No.11	48
Anexo No.12	49
Anexo No.13	51
Anexo No.14	53

## 1. RESUMEN

En este estudio, se evaluó la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L.*) en dos formulaciones farmacéuticas sometidas a condiciones de estabilidad acelerada.

Para conducir el estudio, se realizó una determinación de limoneno en el aceite esencial de cáscara de toronja distribuido comercialmente en Guatemala mediante una cromatografía de gases acoplada a masas. Se encontró que además del limoneno, terpeno más abundante y al cual se le atribuyen propiedades antimicrobianas, el aceite contiene diferentes compuestos propios de las plantas del género *Citrus*, y que a su vez contribuyen con el efecto de inhibición del crecimiento bacteriano.

Posterior a ello, se realizó una prueba de inhibición de crecimiento bacteriano mediante el método de Kirby-Bauer sobre tres diferentes cepas de bacterias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, utilizando concentraciones de aceite esencial de 1-100% disueltas en etanol al 95%. De esta manera se comprobó que en concentraciones de 10 y 100% el aceite resulta efectivo contra las cepas anteriormente mencionadas. Se formularon dos productos farmacéuticos: un gel a base de carbopol y una crema. De cada uno de ellos se realizaron dos lotes: uno con aceite esencial de cáscara de toronja como antimicrobiano y otro lote como blanco. Estos productos fueron sometidos a condiciones de estabilidad acelerada (40°C) durante seis meses y se realizaron pruebas de crecimiento microbiano con el método de Kirby-Bauer, según los tiempos sugeridos por el Reglamento Técnico Centroamericano 11.01.04:10.

Al evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de cáscara de toronja en las formulaciones farmacéuticas, los resultados indican que existe una pérdida de la actividad antimicrobiana del aceite, el cual dejó de inhibir el crecimiento de bacterias al cabo de tres meses.

Estos resultados indican que a pesar de que el aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L.*) posee un efecto antimicrobiano, al incorporarse en formulaciones farmacéuticas y someter las mismas a condiciones de estabilidad acelerada, su actividad se pierde al cabo de tres meses, por lo que es necesario realizar estudios de estabilidad en tiempo real.



## 2. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son principios odoríferos derivados de moléculas de isopreno que pueden extraerse de diferentes partes de las plantas. Se cree que estos aceites poseen importantes funciones dentro de las plantas, actuando como repelentes de insectos o como atractores de polinizadores.

Estas sustancias han sido utilizados ampliamente en el mercado como saborizantes, como carminativos y son popularmente conocidos por sus excelentes propiedades antisépticas, tanto antibacterianas, antimicrobianas y antifúngicas, lo cual ha dado lugar a numerosos estudios sobre dichas propiedades.

Con el paso de los años, el uso de preservantes sintéticos tanto en formulaciones cosméticas como farmacéuticas ha ido en disminución debido a la gran cantidad de efectos adversos o complicaciones de diversos tipos que pueden causar con su uso crónico.

La pureza microbiológica es uno de los problemas más importantes que pueden presentarse en la industria farmacéutica, ya que la presencia de hongos y/o bacterias contenidas en ellos pueden ocasionar no solo problemas a nivel de la fabricación de estos productos, sino también para los consumidores finales, que pueden verse expuestos a infecciones por su uso. (Kunicka-Styczynska, A., Sikora, M. & Kalemba, D., 2009)

Dado que cada vez es más popular el uso de antimicrobianos naturales entre los usuarios, surge la formulación a base de materias primas puramente naturales y de esta forma, la búsqueda de antimicrobianos naturales con capacidades iguales o mejores que las que ofrecen los sintéticos. Es por ello que en la actualidad se han realizado diversos estudios sobre las propiedades de los aceites esenciales, entre ellos, aceites extraídos de plantas del género *Rubus* (Arantes, E. et al., 2011) y del género *Citrus*. (Al-Ani, W.N., Tawfik, N. O. & Shehab, E. Y., 2011)

De este último, se han conducido estudios de aceites esenciales de limón, mandarina, toronja y naranja principalmente, para determinar no solo su actividad antifúngica y antimicrobiana, sino también los componentes principales de estos aceites que pueden conferirles dichas propiedades. (Espina, L., et al., 2011)

Siendo el aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi L.*) uno de los cítricos conocidos por sus cualidades antibacterianas y antifúngicas, surge la idea de su uso en formulaciones farmacéuticas. (Okunowo, W.O., Oyedeji, O., Afolabi, L. O. & Matanmi, E., 2013) De esta manera se determinó la capacidad inhibitoria del crecimiento microbiano del aceite de cáscara de toronja comercializado en Guatemala mediante la técnica de difusión en discos de Kirby-Bauer tanto en ensayos *in vitro*, como su incorporación en formulaciones farmacéuticas.

Bajo condiciones de estabilidad acelerada propuestos por el Reglamento Técnico Centroamericano 11.01.04:10, se determinó que la incorporación de aceite esencial de cáscara de toronja en formulaciones farmacéuticas no es viable, ya que al cabo de tres meses se pierde la actividad antimicrobiana del aceite.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 PROPIEDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES DEL GÉNERO *Citrus*

Debido a la gran cantidad de aceites esenciales que se encuentran en las plantas, dichos compuestos han sido objeto de estudio desde hace décadas. Se estima que en la actualidad se conocen cerca de 3,000 diferentes aceites esenciales de los cuales 300 son comercialmente importantes.

Desde los tiempos antiguos, los aceites esenciales (ver Anexo 1) han sido conocidos por sus excelentes propiedades como antibacterianos y en la actualidad, el estudio de dichas propiedades se ha extendido a estudiar sus efectos sobre hongos, levaduras o mohos que pueden ser un potencial foco de contaminación para numerosos productos de consumo humano. (Badawy, M. & Abdelgaleil, S., 2013)

Los aceites esenciales del género *Citrus* (ver Anexo 1) son conocidos por poseer las propiedades anteriormente mencionadas. Aunque muchos de los componentes de estos aceites como el limoneno o linalool son utilizados para la industria de la perfumería, alimentos, medicamentos, cosméticos, entre otros, en años recientes su uso como antibacterianos y antifúngicos se ha estudiado más de cerca, tanto para la determinación de los componentes del aceite, como para la evaluación de dicha actividad en diferentes estudios. (Okunowo, *et al.*, 2013)

Existen diferentes mecanismos por los cuales los aceites de este género son eficaces contra bacterias, aunque se cree que la acción principal se debe a las características hidrofóbicas de los componentes del aceite. La lipofilia del aceite esencial permite una interacción con los constituyentes lipídicos de la membrana de las células, afectando su permeabilidad y causando cambios en su estructura. (Gomes, M.S., *et al.*, 2014)

Entre los aceites del género *Citrus* más cuidadosamente estudiados están los del limón (*Citrus limón*), lima (*Citrus aurantifolia*), naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*). Debido a que los componentes de estos aceites son básicamente los mismos, tal como se muestra en el Anexo 7a, los compuestos individuales han sido evaluados demostrando actividad antibacteriana contra diferentes microorganismos. (Burt, S., 2004)

Dadas estas propiedades, los aceites de los cítricos se han utilizado como preservantes en varios productos comerciales (Espina, L., et al., 2011), e incluso se han utilizado como pesticidas ya sea solos o en combinación con componentes sintéticos que han demostrado poseer excelentes cualidades en este campo y que en la actualidad constituyen un posible sustituto para los antimicrobianos que regularmente se utilizan. (Viuda-Martos, M. et al., 2007)

### **3.1.1 Propiedades antibacterianas y antifúngicas de la Toronja**

Como se menciona en el Anexo 1, el aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi L.*) es uno de los más estudiados del género *Citrus*. Tanto extractos acuosos como etanólicos y metanólicos y formas de extracción por diversos métodos han permitido enlistar los componentes principales de este aceite, tal como se aprecia en el Anexo 6b.

Aunque el aceite de toronja puede extraerse de diferentes partes de la planta y mediante diferentes técnicas (ver Anexo 1), comercialmente son importantes los aceites de las semillas y de la cáscara. Ambos aceites, al igual que otros aceites derivados de cítricos, han demostrado actividad contra bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Dicho potencial antimicrobiano se ha atribuido principalmente al limoneno: componente mayoritario del aceite. (More, S. et al., 2013)

En el Anexo 7c se pueden apreciar diferentes cepas de bacterias contra las cuales es efectivo el aceite de toronja obtenido por dos diferentes métodos: hidrodestilación y microondas libre de solventes y agua. Puede observarse que el aceite de toronja es un potente inhibidor del crecimiento de bacterias que podrían contaminar diferentes productos industriales de uso humano. (Uysal, B., et al., 2011)

Además de ser antibacteriano, el aceite de *C. paradisi L.* posee propiedades antifúngicas, inhibiendo o disminuyendo el crecimiento de hongos, mohos y levaduras como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium verrucosum*, y *Penicillium chrysogenum*. (Viuda-Martos, M. et al., 2007)

Dadas estas importantes propiedades del aceite de toronja, se ha utilizado en numerosos productos de consumo humano, adquiriendo un papel relevante a nivel industrial. Además el hecho de ser “generalmente conocido como seguro” (GRAS: generally

recognized as safe) lo convierte en un producto seguro y que puede utilizarse en estudios para su uso común. (Espina, L., et al., 2011)

### **3.2 USO DE ACEITES ESENCIALES EN LA INDUSTRIA**

Con el paso de los años se ha hecho más popular el uso de productos naturales entre los usuarios, lo que conduce a la formulación a base de materias primas puramente naturales y de esta forma, la búsqueda de antimicrobianos naturales con capacidades iguales o mejores que las que ofrecen los sintéticos.

Siendo los aceites esenciales ampliamente estudiados y analizados y por sus excelentes propiedades ya mencionadas, estos han sido objeto de estudio para su uso en la industria farmacéutica. Estos últimos deben ser cuidadosamente elaborados para garantizar un proceso libre de impurezas además de ser necesario que los usuarios puedan estar protegidos durante su uso constante. (Arantes, E. et al., 2011)

Aunque se han conducido estudios del uso de aceite esencial de toronja para preservar alimentos y cultivos principalmente, no se ha estudiado su uso en productos farmacéuticos como con otros aceites que han probado ser efectivos como antimicrobianos.

Un ejemplo de aceites esenciales utilizados son los extractos naturales de *Rubus rosaefolius*, siendo la familia *Rosaceae*, al igual que la *Rutaceae*, una de las que contiene importantes propiedades antimicrobianas y antifúngicas. (Arantes, E. et al., 2011)

Aunque en la industria de cosméticos los aceites esenciales han sido utilizados sobre todo en perfumería, productos de masajes y relajantes naturales, su uso como preservantes y el estudio de ellos apenas comienza. Sobre todo los aceites de los cítricos, que presentan agradables aromas, han sido ampliamente empleados para la perfumería, y a pesar de estar demostrado su uso como antimicrobiano y antifúngico, los estudios como antimicrobianos en productos farmacéuticos en específico han sido poco profundizados. (Kunicka-Styczynska, A. et al., 2009)

### 3.3 USO DE ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS EN LA INDUSTRIA

Los antimicrobianos sintéticos han sido ampliamente utilizados por numerosas industrias, incluida la farmacéutica, para evitar el crecimiento de microorganismos o su introducción en los productos terminados o en el momento de su manufactura.

Entre los preservantes antimicrobianos más empleados se encuentran los pertenecientes a la familia de los hidroxibenzoatos o mejor conocidos como parabenos (Anexo 8), los cuales son alquil-ésteres de ácido p-hidroxibenzoico que poseen propiedades tanto antibacterianas como antifúngicas. (Mincea, M., Lupsa, I.R., Cinguita, D.F., Radovan, C.V., Talpos, I. & Ostafe, V., 2009)

Estos compuestos deben su actividad al incremento de la cadena del grupo alquilo, desde metilo hasta n-butilo. En los productos cosméticos, la FDA (Food and Drug Administration) aprueba su uso hasta el 1% de la fórmula original, y han sido utilizados hasta en un 99% de cosméticos fijos y en un 77% de cosméticos de enjuague. (Pedersen, S., Nicoli, M.S., & Santi, P., 2007)

A pesar de que los parabenos se han empleado durante años como antimicrobianos por sus excelentes propiedades y su fácil manejo, en la última década se ha realizado numerosos estudios *in vitro* debido a que han presentado características estrogénicas tanto en ratones como en ratas, que a la larga han desarrollado diferentes tipos de cáncer.

Se ha determinado que a pesar de ser seguros para su uso oral, su toxicidad por vía subcutánea y tópica, sobre todo en cosméticos de uso diario o que se aplican en áreas como las axilas pueden aumentar la incidencia de cáncer de mama. (Harvey, P.W., 2003)

En Estados Unidos, junto a los derivados del formaldehído, liberadores de formaldehído y tanto metilcloroisotiazolinonas y metilisotiazolinonas, los parabenos son los preservantes sintéticos más utilizados y que además, han demostrado ser una de las principales causas del apareamiento de eczemas y alergias a diferentes productos. (Lundov, M.D., Moesby, L., Zachariae, C. & Johansen, J.D., 2008)

Derivado de las propiedades potencialmente tóxicas de los parabenos, se han realizado estudios sobre su acumulación en tejido tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Se ha demostrado que no solamente son compuestos estrogénicos, sino que además pueden actuar

como inhibidores de andrógenos, inhibidores de enzimas sulfotransferasas, poseer actividad genotóxica y aumentar la incidencia de meloma maligno. (Darbre, P.D. & Harvey, P.W., 2008)

#### 4. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala es el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, a través del Departamento de Regulación de Productos Farmacéuticos y Afines, el ente encargado de verificar la calidad tanto de productos farmacéuticos como cosméticos, y de asegurar que al final del proceso de elaboración cumplan con las normas de calidad especificadas en el Reglamento Técnico Centroamericano 11.01.04:10.

Uno de los parámetros más importantes a evaluar en el proceso de fabricación de estos productos es el control microbiológico, ya que los contaminantes como las bacterias, hongos, levaduras y mohos, pueden ser perjudiciales para los usuarios finales de los productos elaborados.

Entre los componentes que han demostrado ser perjudiciales para los usuarios, sobre todo por ser potencialmente cancerígenos, son los preservantes, en especial los parabenos que alcanzaron una gran popularidad por ser fáciles de utilizar además de poseer un amplio espectro de acción antimicrobiano y antifúngico. (Harvey, P.W., 2003)

Debido a los amplios estudios de las propiedades antimicrobianas y antifúngicas del aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi L*), se considera relevante su evaluación como antimicrobiano para su posterior incorporación en formulaciones farmacéuticas siguiendo las especificaciones vigentes para Guatemala en el Reglamento Técnico Centroamericano 11.01.04:10.

La finalidad del estudio fue determinar la capacidad de inhibición del crecimiento microbiano por medio del uso de aceite esencial de cáscara de toronja comercial en Guatemala en tres diferentes cepas bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, mediante el uso de la técnica de difusión en discos de Kirby-Bauer comprobado en ensayos *in vitro*, tanto en el aceite a diferentes concentraciones como en dos formulaciones a evaluar, una emulsión y un gel a base de carbopol.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* del aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*) y su incorporación en formulaciones farmacéuticas mediante pruebas de estabilidad acelerada.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*) contra tres diferentes cepas bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Comprobar mediante estudios *in vitro* que los productos farmacéuticos que utilizan extracto de aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*) cumplen con la normativa RTCA vigente sobre control antimicrobiano.
- Establecer por técnicas *in vitro* la efectividad del aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*) como antimicrobiano natural en dos formulaciones farmacéuticas

## **6. HIPÓTESIS**

La capacidad antimicrobiana del aceite esencial de la cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*) perdura al incorporarse a formulaciones farmacéuticas bajo condiciones de estabilidad acelerada durante seis meses.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Universo de trabajo

Aceites esenciales del genero *Citrus* disponibles comercialmente en Guatemala.

#### 7.1.1 Muestra

Aceite esencial obtenido de la cáscara de toronja *Citrus paradisi L.* que se distribuye comercialmente en Guatemala.

### 7.2 Materiales

#### 7.2.1 Recurso humano

- Autor del trabajo de investigación: Br. María Isabel Ponce Ayala
- Asesor del trabajo de investigación: Lic. Julio Gerardo Chinchilla
- Asesor del diseño estadístico: Dr. Jorge Luis de León Arana
- Revisor del trabajo de investigación: Lic. Lucrecia Peralta de Madriz

#### 7.2.2 Recursos materiales

- Cajas de Petri
- Asas de cultivo microbiológico
- Medios de cultivo bacteriano Müller-Hinton
- Cristalería y equipo de laboratorio
- Balanza semianalítica
- Congelador
- Incubadoras
- Papel filtro
- Autoclave
- Horno
- Materia prima para elaboración de productos farmacéuticos

#### 7.2.3 Productos biológicos

- Cepas ATCC:
  - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
  - *Escherichia coli* ATCC. 25922
  - *Staphylococcus aureus* ATCC. 25923

- Aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*), Aceites Esenciales Extract, S.A.

### 7.3 Métodos

#### 7.3.1 Determinación de Limoneno en aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*) mediante cromatografía de gases.

Para tener un parámetro comparativo sobre el cual determinar la actividad antimicrobiana del aceite de cáscara de toronja, se procedió a determinar la presencia de limoneno (uno de los componentes mayoritarios del aceite de cáscara de toronja) en el aceite comercial mediante un cromatógrafo de gases (ver Anexo 10).

Para dicha determinación, se solicitó un análisis a través del Centro de Información y Asesoría Toxicológica (CIAT) de la Escuela de Química Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Ya determinada la presencia de limoneno, se procedió a realizar los estudios *in vitro* del aceite esencial de cáscara de toronja.

#### 7.3.2 Determinación *in vitro* de actividad antimicrobiana del aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi L*)

Para determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi L*) se utilizaron 3 cepas bacterianas ATCC:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC. 25923

Para ello se llevó a cabo la técnica de difusión en agar en placas (prueba de susceptibilidad de difusión en discos, Kirby-Bauer). Se colocaron las placas con agar Müeller-Hinton en cajas de Petri a 40°C inoculadas con las diferentes cepas bacterianas anteriormente mencionadas, utilizando como estándar de referencia la técnica de McFarlan.

A cada placa de las cepas se le colocaron cinco discos estériles de papel filtro Whatman impregnados con aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi*

L) a diferentes concentraciones. Posteriormente las cajas Petri se incubaron a 40°C por 24-48 horas dependiendo de la cepa.

De igual forma, se realizaron controles para cada una de las cepas de crecimiento bacteriano en agar Müeller-Hinton.

Para la actividad antimicrobiana del aceite, posterior al tiempo de incubación se determinó una inhibición positiva o negativa del crecimiento bacteriano alrededor de cada disco en concentraciones del 10-100% del aceite en etanol al 95%.

La aparición de un halo determina la sensibilidad de las bacterias frente a las soluciones de aceite esencial. Se consideró como inhibitorio la ausencia de bacterias. (Koneman, E., Allen, S., Dowell, V., Janda, W., y Sommers, H., 1992)

### **7.3.3 Formulación de productos farmacéuticos**

Posterior a la determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*), se procedió a la formulación de dos diferentes productos farmacéuticos: una crema y un gel a base de carbopol hidratado con agua, utilizando distintas materias primas en el laboratorio del departamento de Farmacia Industrial de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Se realizaron 2 diferentes lotes de cada uno de los productos:

- Un lote utilizando como antimicrobiano aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*).
- Un lote blanco como control.

Como concentración para elaboración de los productos farmacéuticos, se utilizó como referencia la concentración de aceite determinada en el apartado 7.3.2.

### **7.3.4 Ensayo de estabilidad acelerada para productos farmacéuticos**

Para la determinación de la estabilidad de los productos farmacéuticos, estos fueron sometidos a estabilidad acelerada en un horno a 40°C durante 6 meses según lo establecido por el Reglamento Técnico Centroamericano para medicamentos 11.01.04:10.

Las observaciones de la estabilidad de los productos se realizaron también según lo indicado en dicha normativa a los 0, 45, 90, 135 y 180 días de su almacenamiento en los cuales se tomaron muestras para su análisis y observación.

### 7.3.5 Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*) posterior a su incorporación en formulaciones farmacéuticas

A los tiempos establecidos en el ensayo de estabilidad de los productos farmacéuticos, se tomó una muestra de cada uno de los lotes elaborados para su análisis de crecimiento microbiano mediante la determinación *in vitro* de actividad antimicrobiana y la prueba de susceptibilidad de difusión en discos, Kirby-Bauer anteriormente mencionada.

## 7.4 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó en dos etapas:

- Etapa 1: Determinación *in vitro* de actividad antimicrobiana del aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi L*)

$\gamma_x = Pseudomonas aeruginosa$  ATCC 27853

Aceite a diferentes concentraciones  $\gamma_x = Escherichia coli$  ATCC 25922

$\gamma_x = Staphylococcus aureus$  ATCC 25923

### 7.4.1 Etapa 2: Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*) posterior a su incorporación en formulaciones farmacéuticas

Análisis estadístico de diseño de factores:

<i>Tiempo</i>	<i>Crema</i>		<i>Gel</i>	
	Aceite	Blanco	Aceite	Blanco
<i>t0</i>	X <sub>111</sub>	X <sub>121</sub>	X <sub>211</sub>	X <sub>221</sub>
<i>t45</i>	X <sub>112</sub>	X <sub>122</sub>	X <sub>212</sub>	X <sub>222</sub>
<i>t90</i>	X <sub>113</sub>	X <sub>123</sub>	X <sub>222</sub>	X <sub>223</sub>

t= tiempo en días

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Determinación de limoneno en aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L.*) mediante cromatografía de gases.

Tres muestras de aceite puro de cáscara de toronja (sin disolventes), que se distribuye comercialmente en Guatemala, se analizaron por medio de cromatografía de gases-masas obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla No. 1. Resultados de determinación de limoneno en aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L.*) mediante cromatografía de gases-masas**

No.	Componente	Tiempo de Retención (min)	Norm (%)
1	Pineno isómero R	1.799	4.55
2	1-Octanol	3.945	2.37
3	2-Carene	4.06	1.90
4	trans-p-menta-2,8-dienol	4.575	3.07
5	<b>Óxido de limoneno (estereoisómero)</b>	<b>4.665</b>	<b>5.12</b>
6	<b>(+)-E-Óxido de limoneno</b>	<b>4.72</b>	<b>2.93</b>
7	Citronellal	4.93	2.55
8	Terpinen-4-ol	5.36	4.63
9	Decanal	5.76	5.97
10	Cis-carveol	5.99	3.93
11	(-)-Carvone	6.316	4.18
12	Geraniol	6.431	1.00
13	Citral	6.656	3.78
14	Copaene	7.701	3.00
14	Acetato de geranil	8.206	2.60
16	Caryophyllene	8.767	5.93
17	Humuleno	9.182	5.86
18	Cubebeno	9.522	3.13
19	á-Muuroleno	9.747	2.02
20	δ-Cadineno	10.052	1.73
21	Caryophyllene oxide	10.837	5.81
22	Heneicosano	18.28	1.35
23	Squaleno	21.647	3.76
24	á-Sitosterol	25.328	1.34
25	dl-á-Tocopherol	26.623	10.41

Componentes listados en orden de elusión. Oven: Initial temp 70°C for 2 min, ramp 10°C/min to 220°C, hold 0 min, ramp 15°C/min to 290°C, hold 15 min, Inj=270°C, Volume=0 µL, Split=1:1, Carrier Gas=He, Solvent Delay=1.00 min, Transfer Temp=230°C, Source Temp=230°C, Scan: 35 to 450Da, Column 30.0m x 320µm

FUENTE: Datos experimentales, CIAT.

## 8.2 Determinación *in vitro* de actividad antimicrobiana del aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi L*)

Se realizaron pruebas *in vitro* del aceite esencial de cáscara de toronja a diferentes concentraciones, utilizando el método de difusión en agar en placa y como disolvente etanol al 95%, contra tres diferentes cepas de bacterias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Para cada dilución se realizaron siete repeticiones. Los resultados fueron sometidos al test de Cochran's Q utilizando el programa STATA versión 12.1.

**Tabla No. 2. Resultados de determinación *in vitro* de actividad antimicrobiana del aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi L*) a diferentes concentraciones en etanol al 95%**

No. de Repetición	1							2							3							4							5							6							7						
	1% <sup>a</sup>	10% <sup>b</sup>	30% <sup>c</sup>	50% <sup>d</sup>	70% <sup>e</sup>	100% <sup>f</sup>	1%	10%	30%	50%	70%	100%	1%	10%	30%	50%	70%	100%	1%	10%	30%	50%	70%	100%	1%	10%	30%	50%	70%	100%	1%	10%	30%	50%	70%	100%	1%	10%	30%	50%	70%	100%							
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	

1= inhibición de crecimiento bacteriano

0= no hay inhibición del crecimiento bacteriano

a= 0.05mL de aceite puro/4.95mL de Etanol 95%; b= 0.5mL de aceite puro/4.5mL de Etanol 95%; c= 1.5mL de aceite puro/3.5mL de Etanol 95%; d= 2.5mL de aceite puro/2.5mL de Etanol 95%; e= 3.5mL de aceite puro/1.5mL de Etanol 95%; f= 5mL de aceite puro/0mL de Etanol 95%

Para *P. aeruginosa*

Number of obs = 42

Cochran's chi2(1) = 5

Prob > chi2 = 0.0253

Exact p = 0.0625

Para *E. coli*

Number of obs = 42

Cochran's chi2(1) = 7

Prob > chi2 = 0.0082

Exact p = 0.0156

Para *S. aureus*

Number of obs = 42

Cochran's chi2(1) = 13

Prob > chi2 = 0.0003

Exact p = 0.0002

FUENTE: Datos Experimentales



### 8.3 Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*) posterior a su incorporación en formulaciones farmacéuticas

Para determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de cáscara de toronja incorporado a productos farmacéuticos, se elaboraron dos diferentes formulaciones: una crema y un gel a base de carbopol. Ambos productos fueron sometidos a condiciones de estabilidad acelerada y se realizó un ensayo de difusión en agar en placa siendo un resultado positivo aquel en el que se inhibiera el crecimiento de las tres cepas bacterianas y negativo cuando el crecimiento de una o más cepas no fue inhibido. Los resultados fueron sometidos al ensayo de Cochran's Q utilizando el programa STATA versión 12.1 y pueden apreciarse en la Tabla No. 3.

**Tabla No. 3. Resultados de la evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*) posterior a su incorporación en formulaciones farmacéuticas**

Tiempo <sup>a</sup>	Crema		Gel	
	aceite	blanco	aceite	blanco
t0	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	0	1	0
t45	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	0	1	0
t90	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0

a=Tiempo en días

FUENTE: Datos experimentales

1= inhibición de crecimiento bacteriano; 0= no hay inhibición del crecimiento bacteriano

Para la crema:

Number of obs = 18

Cochran's chi2 (1) = 12

Prob > chi2 = 0.0005

Exact p = 0.0005

Para el gel:

Number of obs = 18

Cochran's chi2 (1) = 12

Prob > chi2 = 0.0005

Exact p = 0.0005

## 9. DISCUSIÓN

Durante los últimos años se ha dado un incremento en la búsqueda de nuevas materias primas naturales para el desarrollo e innovación de la industria farmacéutica. Dichos componentes resultan una opción más saludable para los usuarios y más amigable con el medio ambiente, que las materias primas sintéticas comúnmente utilizadas que son potencialmente cancerígenas.

En la presente investigación, se utilizó aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi* L.) para evaluar su potencial actividad antimicrobiana y su incorporación en formulaciones farmacéuticas bajo condiciones de estabilidad acelerada.

Uno de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales extraídos de los cítricos es el limoneno. Los resultados de los diferentes compuestos del aceite esencial de cáscara de toronja obtenidos por cromatografía de gases-masas se pueden apreciar en la Tabla No.1. En dicha tabla se muestran (en negrita) los valores obtenidos para ambos estereoisómeros del limoneno. En este caso los valores obtenidos fueron de 5.12 y 2.93%, los cuales se obtuvieron mediante una técnica conocida como “normalización de área”, el cual es un medio que permite establecer el porcentaje de cada componente en la muestra estudiada. (Escuela de Química: Universidad Central de Venezuela, 2008)

Por las propiedades ya mencionadas del limoneno, previo a evaluar la actividad antimicrobiana del aceite de cáscara de toronja, fue necesario realizar una determinación (mediante cromatografía de gases-masas) de los componentes del aceite distribuido comercialmente en Guatemala (ver Anexo 11), el cual cumple con todos los estándares de calidad establecidos para este tipo de productos.

Además del porcentaje de limoneno en la muestra, se pudo determinar que existen otros componentes del aceite que poseen características antimicrobianas. Algunos de ellos son el  $\alpha$ -pineno, el linalool o el sabineno, los cuales pertenecen al grupo de los terpenos y han demostrado poseer cualidades antimicrobianas que al combinarse, pueden aportar un efecto sinérgico. (Uysal, B., et al., 2011) Debido a que el aceite de cáscara de toronja posee una enorme cantidad de componentes, en la Tabla No.1 solamente se presentan los que se encontraron en mayor concentración. Los cromatogramas de las tres muestras analizadas

pueden observarse en el Anexo 12 y puede afirmarse que el aceite esencial de cáscara de toronja comercializado en Guatemala contiene limoneno y demás componentes encontrados, los cuales son comunes del género *Citrus* según lo reportado en la literatura. (Minh Tu et al., 2002; Tao et al., 2009; Flamini & Cioni, 2010)

Los resultados de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de cáscara de *Citrus paradisi L.* se evaluaron mediante la prueba de Kirby-Bauer y pueden apreciarse en la Tabla No.2. Estadísticamente se aplicó el ensayo de Cochran Q, el cual evalúa la hipótesis nula de no efecto. Los valores de significancia ( $p$ ) obtenidos para cada grupo de bacterias y cada concentración indican que existe una diferencia significativa entre la actividad antimicrobiana del aceite en cada concentración estudiada, por lo que se concluye que la actividad antimicrobiana del aceite es dependiente de la concentración evaluada en cada caso.

El aceite esencial en concentraciones del 10 y 100% inhibió el crecimiento de todas las bacterias en todas las repeticiones. Debido a este resultado y a la naturaleza de los productos farmacéuticos a formular, se utilizaron concentraciones del 10% de aceite esencial de cáscara de toronja para incorporarlo en los productos farmacéuticos y evaluar su capacidad antimicrobiana. Las formulas finales para la elaboración de los productos farmacéuticos pueden apreciarse en el Anexo 13.

Los resultados del ensayo de estabilidad practicado tanto en los lotes de crema como de gel formulados se presentan en la Tabla No.3 en la que puede apreciarse que para las tres cepas de bacterias estudiadas (estipuladas por el RTCA 11.01.04:10), el crecimiento se vio inhibido al tiempo 0 en los lotes que contenían aceite esencial de cáscara de toronja, mientras que para los lotes blanco el crecimiento bacteriano no fue inhibido, tal como se esperaba.

Estos resultados al tiempo 0 eran los esperados debido a que en la fase de evaluación de capacidad antimicrobiana del aceite, se observó una inhibición del crecimiento bacteriano. Sin embargo, luego de tres meses bajo condiciones de estrés, el efecto inhibitorio del aceite esencial de cáscara de toronja se perdió, por lo que se observó el crecimiento de bacterias.

Aunque idealmente se esperaba que con el paso del tiempo y bajo las condiciones de estrés estipuladas el aceite esencial de cáscara de *Citrus paradisi L.* permaneciera ejerciendo su efecto antimicrobiano, el resultado obtenido fue el contrario y al cabo de tres meses se perdió

dicho efecto. Se acepta entonces la hipótesis alternativa ( $H_A$ ): la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de la cascara de toronja (*Citrus paradisi L*) no perdura al incorporarse a formulaciones farmacéuticas bajo condiciones de estabilidad acelerada durante seis meses.

Al analizar los resultados, estas diferencias de capacidad antimicrobiana pudieron darse por varias causas. Debido a la naturaleza volátil de los aceites esenciales, es posible que existiera una pérdida de los componentes del aceite esencial por evaporación, permitiendo que las bacterias continuaran su crecimiento (Turek, C. & Stintzing, F.C., 2013). La exposición al calor durante un período prolongado de tiempo y su manipulación pudieron producir la pérdida de su efecto, tal y como se ha reportado en otros estudios similares. (Tiên Do, T.K., Hadji-Minaglou, F., Antoniotti, S. & Fernandez, X., 2014)

Estudios realizados por Chalchat, J.C. y otros (2011) también han demostrado que los mayores cambios en los aceites volátiles se deben a la acción del calor y al almacenamiento. Bajo estas condiciones, se produce un incremento de compuestos oxigenados a expensas de los hidratos de carbono presentes. Entre estos compuestos, el limoneno y el  $\alpha$ -pineno han demostrado sufrir la mayor alteración en las condiciones ya mencionadas, llegando el limoneno a disminuir hasta convertirse posteriormente en monóxido de linalool y  $\alpha$ -terpinelol (Chalchat, J.C. *et al.*, 2011)

Estos efectos sobre la pérdida de la función del limoneno (principal componente al que se le atribuye la actividad antimicrobiana) y la aparición de moléculas provenientes de la auto oxidación de este terpenoide pudieron ser los causantes de la progresiva pérdida de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de cáscara de toronja al momento de incorporarlo en las formulaciones farmacéuticas.

También es importante mencionar la susceptibilidad de las bacterias estudiadas, ya que tanto *E. coli* como *S. aureus* son bacterias anaerobias facultativas mucho más resistentes que *P. aeruginosa*, la cual es una bacteria aerobia mucho más susceptible cuyo crecimiento fue más fácilmente inhibido. En la mayoría de los casos, al cabo de 90 días, se observó que las bacterias tuvieron un crecimiento similar al del blanco, sin llegar a apreciarse un halo de inhibición alrededor del taxo (ver Anexo 14). Este comportamiento se observó en las tres repeticiones realizadas para cada muestra, por lo que el efecto antimicrobiano del aceite esencial de cáscara de toronja incorporado a formulaciones farmacéuticas no es factible.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1** El aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L.*) posee capacidad antimicrobiana contra tres diferentes cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), en concentraciones del 10 y 100%.
- 10.2** El aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L.*) no posee efecto antimicrobiano en formulaciones farmacéuticas sometidas a pruebas de estabilidad acelerada al no inhibir el crecimiento de bacterias al cabo de 90 días.
- 10.3** El gel a base de carbopol y la emulsión que contenían aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus apradisi L.*), no cumplen con la normativa RTCA vigente para ausencia de bacterias en condiciones de estabilidad acelerada.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Continuar con el estudio del aceite esencial de cáscara de *Citrus paradisi L.* en formulaciones farmacéuticas diferentes a las estudiadas en la presente investigación.
- 11.2 Realizar estudios del aceite esencial de semillas de *Citrus paradisi L.* como potenciales antimicrobianos en formulaciones farmacéuticas.
- 11.3 Realizar estudios de estabilidad en anaquel (tiempo real) del aceite esencial de cáscara de toronja *Citrus paradisi L.* incorporado en formulaciones farmacéuticas.
- 11.4 Promover el estudio de plantas del género *Citrus* cultivadas en Guatemala para su utilización en diferentes procesos industriales.

## 12. REFERENCIAS

- Al-Ani, W.N., Tawfik, N. O. & Shehab, E. Y. (2011). Antimicrobial activity of grapefruit seeds extracts (*In vitro* Study). *Al-Rafidain Dent Journal*, 11 (2), 341-345.
- Arantes, E. et al. (2011). *Rubus rosaefolius* Extract as a natural preservative candidate in topical formulations. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12 (2), 732-737.
- Badawy, M. & Abdelgaleil, S. (2013). Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Industrial Crops and Products*, (52), 776-782.
- Barrientos, N.E. (2005). *Propuesta para la creación y lanzamiento de productos nuevos en la industria cosmética Guatemalteca*. (Tesis de Pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala: Facultad de Ingeniería, Guatemala.
- Burt, S. (2004) Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, (94), 223-253.
- Cerón-Salazar, I. & Cardona-Alzate, C. (2011). Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja. *Ingeniería y Ciencia*, 7(13), 65-86.
- Chalchat, J.C., Chiron, F., Garry, R., Lacoste, J. & Sautou, V. (2011). Photochemical hydroperoxidation of terpenes. Antimicrobial activity of  $\alpha$ -Pinene and Limonene Hydroperoxides. *Journal of Essential Oil Research*, 12(1), 125-134.
- Darbre, P.D & Harvey, P.W. (2008). Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of Applied Toxicology*, (28), 561-578.
- Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica. (2012). Aceites volátiles y compuestos afines constituyentes, propiedades, métodos de obtención y usos. Universidad de San Carlos de Guatemala: Guatemala.

- Espina, L., et al. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils an evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Elsevier: Food Control*, (22), 896-902.
- Farid, C. (2010). Techniques for Oil Extraction. En M. Sawamura. (1°Ed.), *Citrus Essential Oils: Flavor and Fragrance*. (pp. 9-36). Singapur: John Wiley & Sons. Recuperado de:<http://hinarilogin.research4life.org/uniquesigonlineibrary.wiley.com/uniquesig0/book/10.1002/9780470613160>
- Flamini, G. & Cioni, P.L. (2010). Odour gradients and patterns in volatile emission of different plant parts and developing fruits of grapefruit (*Citrus paradise L.*). *Food Chemistry*, 120, 984-992.
- Gomes, M.S., et al. (2014). Use of Essential Oils of the Genus *Citrus* as Biocidal Agents. *American Journal of Plant Sciences*, (5), 299-305.
- Harvey, P. W. (2003). Parabens, Ostrogenicity, Underarm cosmetics and Breast Cancer: a Persective on a Hypothesis. *Journal of applied Toxicology*, (23), 285-288.
- Imram, K. et al. (2013). Extraction and applications of Grapefruit (*Citrus paradisi*) peel oil against *E. coli*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12 (6), 534-537.
- Kirbaslar, S. I., Boz, I & Kirbaslar, F. G. (2006).Composition of Turkish Lemon and Grapefruit Peel Oils. *Journal of Essential Oil Research*, (18), 525-543.
- Kirchner, J.G. & Miller, J.M. (1953). Volatile oil constituents of grapefruit juice. *Agricultural and Food Chemistry*, 7(1), 512-518.
- Koneman, E., Allen, S., Dowell, V., Janda, W., & Sommers, H. (1992). Diagnóstico microbiológico. (3era. Edición.) Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires Argentina.
- Kunicka-Styczynska, A., Sikora, M. & Kalemba, D. (2009). Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. *Journal of Applied Microbiology*, (107), 1903-1911.



- Lam, H. M. (2013). *Chemical composition and functional properties of Vietnamese pomelo (Tan Trieu, ThanhTra, Doan Hung) peel's essential oil extracted by cold-pressing and vacuum hydro-distillation methods* (Tesis de pregrado). School Of Biotechnology, International University, Hochiminh.
- Lundov, M.D., Moesby, L., Zachariae, C. & Johansen, J.D. (2008). Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermatitis*, (60), 70-78.
- Mincea, M., Lupsa, I.R., Cinguita, D.F., Radovan, C.V., Talpos, I. & Ostafe, V. (2009). Determination of methylparaben from cosmetic products by ultra-performance liquid chromatography. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74 (6), 669-676.
- Minh Tu, N.T., Thanh, L.X., Une, A., Ukeda, H. & Sawamura, M. (2002). Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 169-174.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. (2007). Reglamento Técnico Centroamericano: Productos Cosméticos. Verificación de la Calidad. Guatemala: 71.03.45:07
- Mondello, G., Casilli, A., Quinto, P, Cicero, L., Dugo, P. & Dugo, G. (2003). Comparison of Fast and Convencional GC Analysis for Citrus Essential Oils. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, (51), 5602-5606.
- More, S., Sathe, S., Sonawane, A., Jadhav, A. & Kadam, V. (2013). *Citrus paradisi*: An Overview. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 3 (10), 8070-8077.
- Moufida, S & Marzouk, B. (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 62, (8), 1283-1289
- Newhall, W.F. & Kesterson, J.W. (1961). Factors affecting the autoxidation of D-limonene during storage. *Florida Agricultural Experiment Station Journal*, 1355, 239-243.
- Njoroge, S.M., Koaze, H., Karanja, P.N. & Sawamura, M. (2005). Volatile compounds of redblush grapefruit (*Citrus paradisi*) and Pummelo (*Citrus grandis*) peel essential oils form Kenya. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, (53), 9790-9794.

- Okunowo, W.O., Oyedeji, O., Afolabi, L. O. & Matanmi, E. (2013). Essential Oil of Grape Fruit (*Citrus paradisi*) Peels and its Antimicrobial Activities. *American Journal of Plant Sciences*, (4), 1-9.
- Pedersen, S., Nicoli, M.S., & Santi, P. (2007). *In vitro* skin permeation and retention of parabens from cosmetic formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, (29), 361-367.
- Rivas da Silva, A.C., Lopes, P.M., Barros de Acevedo, M.M., Costa, D.C., Alviano, C.S & Alviano, D.S. (2012). Biological activities of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene enantiomers. *Molecules*, 17(6), 6305-16.
- Sharma, M. C., & Sharma, S. (2010). Phytochemical Screening and *In vitro* antimicrobial activity of combined *Citrus paradise* and *Ficus carica* Linn Aqueous extract. *International Journal of Microbiological Research*, 1 (13), 162-165.
- Soto, L. (2010). *Composición y actividad microbiana del aceite esencial de toronja (Citrus paradisi)* (Tesis de maestría). Universidad de Zulia: Facultad de Ingeniería, Maracaibo.
- Tao, N.G., Liu, Y.J. & Zhang, M.L. (2009). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1281-1285.
- Tiên Do, T.K., Hadji-Minaglou, F., Antoniotti, S. & Fernandez, X. (2014). Authenticity of essential oils. *Trends in Analytical Chemistry*, 66, 146-157
- Turek, C. & Stintzing, F.C. (2013). Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 40-53
- Universidad Central de Venezuela. (2008). Guía de Cromatografía. Facultad de Ciencias: Escuela de Química, Caracas: Venezuela.
- Us, J.S. (2013). *Estudio de estabilidad acelerada en lotes piloto de un gel exfoliante elaborado a base de cáscara de huevo por medio de la cuantificación de calcio disuelto*. (Tesis de Pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.

- Uysal, B., Sozmen, F., Aktas, O., Oksal, B. & Kose, E. O. (2011). Essential oil composition and antibacterial activity of the grapefruit (*Citrus paradisi. L*) peel essential obtained by solvent-free microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *International Journal of Food, Science and Technology*, (46), 1455-1461.
- Vimal, M., Vijaya, P.P., Mumtaj, P. & Seema Farhath, M.S. (2013). Antibacterial activity of selected compounds of essential oils from indigenous plants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(1), 248-253.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. & Pérez-Álvarez, J. (2007). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. *Elsevier: Food Control*, (19), 1130-1138.
- Wang, Z., Ding, L., Li, T. (2006). Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cynimum L.* and *Zanthoxylum hungeanum Maxim.* *Journal of Chromatography*, (1102), 11-17.

## 13. ANEXOS

### ANEXO NO.1: Teoría

#### 13.1 GENERALIDADES DEL GÉNERO *Citrus*

El género *Citrus* pertenece a un taxo de plantas con flores de la familia *Rutaceae*, el cual comprende cerca de 150 géneros y 900 especies. Entre los frutos que forman parte de este género se encuentran las naranjas, limones, limas, pomelos, mandarinas y toronjas. (Uysal, B., Sozmen, F., Aktas, O., Oksal, B. & Kose, E. O., 2011)

Las plantas de esta familia, se caracterizan por presentar hojas alternas y opuestas, simples, palmadas o pinnadas, que en algunos casos pueden estar reducidas a espinas o estípulas. Las flores son bisexuales, actinomorfas que pueden encontrarse en varios tipos de inflorescencia. Los frutos suelen presentarse en forma de cápsula valvada o de baya especializada que se conoce como hesperidio, aunque también pueden presentarse en forma de baya, drupa o una sámara.

Los frutos cítricos (como regularmente se les conoce), pueden encontrarse de diferentes formas y colores, aunque por lo regular van de la forma oblonga a la esférica y en tonos de colores que van desde el amarillo verdoso hasta el naranja oscuro e incluso brillante que se observa en la madurez. (Soto, L., 2010)

En general, los frutos poseen una estructura conocida y bien definida (ver Anexo2). En la parte externa de los frutos, se encuentra el flavedo, zona coloreada y compacta que se encuentra constituido por el epicarpio que forma la epidermis del fruto. Es en la epidermis en donde se encuentran numerosos estomas además de la hipodermis, que a su vez está compuesta por clorénquima con células con abundantes cloroplastos amarillos y una gruesa capa de parénquima acuoso. Lo distintivo del flavedo es que es justamente en esta capa en donde se encuentran las glándulas de aceite que generalmente se distinguen en la superficie de la planta como puntos redondos y hundidos.

En el albedo, que es la capa interna de la fruta de color blanco y esponjosa, se encuentran células de paredes delgadas que dejan espacios vacíos entre ellas y que se continúan al interior de la fruta para formar los tabiques que separan los carpelos (comúnmente llamados gajos) que finalmente se unen al centro de la fruta. (Farid, C., 2010)

Las frutas del género *Citrus* son de gran importancia a nivel mundial, ya que la producción mundial de los mismos alcanza hasta un 65% del total de fruta producida anualmente. Los frutos son populares no solo por su sabor, sino también por su refrescante aroma, por ser importante fuente de vitamina C, así como por la facilidad con la que pueden ser cultivados en diferentes regiones del mundo. (Lam, H. M., 2013)

Además de la importancia de los cítricos anteriormente mencionada, cada vez es más popular el uso de aceites esenciales que pueden obtenerse por diferentes técnicas (discutidas más adelante). Los aceites de estas frutas han demostrado ser útiles en diferentes industrias, que incluyen alimentos, bebidas, medicamentos, cosméticos, aromaterapia y agricultura, entre otros. (Lam, H. M., 2013)

### **13.1.1 Generalidades de la toronja (*Citrus paradisi L.*)**

Como se mencionó anteriormente, el género *Citrus* cuenta con una gran variedad de frutos entre los cuales puede destacarse la toronja (*Citrus paradisi L.*). Nativa de la isla de Barbados y considerada un híbrido entre el pomelo y la naranja dulce (Uysal, B., et al., 2011), la toronja es hoy en día considerada la segunda fruta más importante del género *Citrus*.

Los árboles de toronja alcanzan alturas entre los 4.5-6m, e incluso se han reportado árboles de hasta 13.7m. La parte más alta suele ser redondeada y con numerosas ramas dispersas. Las hojas son largas y ovaladas con punta lanceolada, miden entre 7.5-15cm de largo y entre 4.5-7.5cm de ancho de color verde oscuro. Las ramas pueden desarrollar espinas poco afiladas y las flores son blancas con 4 pétalos. Éstas últimas suelen medir entre 4.5-5cm a lo ancho y pueden darse ya sea de manera individual o en pequeños grupos. (More, S., Sathe, S., Sonawane, A., Jadhav, A. & Kadam, V., 2013)

Las frutas de la toronja (ver Anexo 3) son casi redondas o de forma ovalada similar a la forma de una pera. Estos frutos pueden medir entre 10-15cm y son de color limón pálido, en ocasiones con sombreado rosa. Poseen un flavedo liso con una gran cantidad de poros en toda la superficie y que puede alcanzar un grosor de hasta 1cm. La pulpa es color amarillo pálido, rosa pálido o rojo intenso con vesículas llenas de

jugo fácilmente visibles. Las semillas son blancas, con forma elíptica y punteadas de cerca de 1.25cm de largo y que usualmente son poliembrionarias. (Imram, K. et al., 2013)

La toronja ha atraído la atención en los últimos años por sus numerosas propiedades que han sido ampliamente estudiadas. Se ha utilizado en medicina tradicional en varios países alrededor del mundo, además de sus propiedades antibacteriales, antifúngicas, antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales, astringentes y preservantes. (Uysal, B., et al., 2011),

Farmacológicamente ha demostrado poseer actividad anticancerígena, antireumática, limpiadora y desintoxicante, además de ayudar a mantener la función cardíaca, disminuir el colesterol, ser utilizado como regenerador celular y para la pérdida de peso. (More, S. et al., 2013)

Aunque la toronja es nativa del Caribe como se mencionó anteriormente, la facilidad con la que crece en diferentes regiones ha permitido que se cultive a lo largo del mundo. En Guatemala, a pesar de que comúnmente se cultiva mayoritariamente limón y mandarina, la toronja puede encontrarse en numerosas regiones del país, incluidas la Costa Sur y el oriente del país.

Los beneficios de la toronja ya mencionados, se acompañan de las importantes características y cualidades que posee el aceite esencial que se extrae tanto de la cáscara como de las semillas del fruto. Los estudios de propiedades antimicrobianas, antifúngicas, germicidas, antioxidantes y anticancerígenas han permitido que el aceite se utilice en diversos productos de la industria, por lo que resulta beneficioso conducir nuevos estudios sobre sus propiedades y funciones. (Okunowo, W.O., et al., 2013)

## **13.2 ACEITES ESENCIALES**

Los aceites esenciales son principios odoríferos derivados de moléculas de isopreno que pueden extraerse de diferentes partes de las plantas. Se cree que estos aceites poseen importantes funciones dentro de las plantas, actuando como repelentes de insectos o como atractores de polinizadores.

Estos principios odoríferos han sido ampliamente utilizados por la humanidad con el paso de los años. Desde los antiguos egipcios, fenicios, chinos, griegos, romanos e incluso los mayas y aztecas, la perfumería y el conocimiento de las fragancias ha ido acompañado del uso de aceites esenciales. (Farid, C., 2010)

Dichos componentes son mezclas de componentes altamente volátiles (llamados etéreos) como los terpenos y otros compuestos oxigenados que pueden ser extraídos de diferentes partes de las plantas, incluyendo las hojas, flores, ramas, semillas, cortezas, frutos e incluso la madera y las raíces por medio de diferentes métodos.

En la actualidad, los aceites esenciales han atraído la atención de los científicos alrededor del mundo sobre todo por ser una fuente natural de antioxidantes y otros componentes biológicamente activos.

Las familias de plantas como *Lamiaceae*, *Laureaceae*, *Myrtaceae* y *Rutaceae* son ampliamente conocidas por su riqueza en aceites esenciales. En especial, los cítricos pertenecientes a la familia *Rutaceae* son conocidos por presentar sacos oleíferos en las hojas que pueden observarse fácilmente a trasluz, además de que muchos miembros de esta familia presentan aceites en el pericarpio y tejido parenquimatoso de los frutos. (Soto, L., 2010)

### **13.2.1 Aceites esenciales del género *Citrus***

El género *Citrus* contiene cantidades importantes de aceites esenciales que pueden extraerse de numerosas partes de la planta, incluyendo las hojas, frutos, flores e incluso de las semillas (ver Anexo 4). Es por ello que es de vital importancia el estudio de la composición de los aceites, así como de las propiedades que pueden ser utilizadas para la producción de diferentes productos a nivel industrial. (Espina, L., et al., 2011)

La mayor parte de los aceites esenciales contienen hidrocarburos monoterpénicos, entre los cuales los más importantes son el limoneno,  $\beta$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno, mirceno y sabineno. (Mondello, G. et al., 2003)

Los aceites esenciales de los cítricos están formados por entre el 85 al 99% de componentes no volátiles y del 1 al 15% de componentes volátiles. Entre las sustancias no volátiles más abundantes se encuentran principalmente los monoterpénicos que representan hasta el 97% de la composición del aceite, además de sesquiterpenos,

moléculas hidrocarbonadas, aldehídos, cetonas, ácidos, alcoholes y diferentes ésteres. (Soto, L., 2010)

El componente principal de los aceites de los cítricos suele ser justamente un monoterpeno: el limoneno, componente al cual se le atribuyen numerosas cualidades y características que han sido aprovechadas por diversas industrias. Aunque los componentes de los cítricos suelen ser los mismos (ver Anexo 5), las cantidades pueden variar dependiendo de la especie y en algunos casos, ciertos compuestos específicos le confieren diferentes propiedades a los aceites. (Moufida, S. & Marzouk, B., 2003)

El hecho de que el limoneno sea uno de los componentes volátiles más abundantes de los aceites esenciales ha conducido a estudiar más de cerca las propiedades de esta molécula en ensayos *in vitro* (Vimal, M. et. al., 2013), para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias MIC (concentración mínima a la que una sustancia inhibe el crecimiento de bacterias) ante diferentes cepas de bacterias. De esta manera se ha logrado determinar concentraciones no solo de limoneno, (Chalchat, J.C., et. al., 2011) sino también de otras sustancias que forman parte de los aceites esenciales y que poseen actividad antimicrobiana. Las concentraciones mínimas inhibitorias del limoneno, que es especialmente abundante en la toronja, pueden observarse en el Anexo 10.

Debido a que los aceites esenciales se evaporan con facilidad por su composición etérea, es necesario contar con técnicas adecuadas que permitan a la vez una correcta y eficiente obtención de los mismos. Con el paso del tiempo, se han desarrollado diferentes técnicas que permiten no solo la obtención de los mismos, sino aumentar el grado de pureza de estos y lograr preservarlos para sus diferentes usos. Las formas de extracción de aceites tanto convencionales como las que han sido recientemente introducidas serán detalladas en el siguiente apartado. (Farid, C., 2010)

### **13.2.2 Métodos de extracción de aceites esenciales**

De acuerdo a las normas ISO, los aceites esenciales son productos que se obtienen de las plantas aislándolos únicamente por medios físicos: destilación, expresión o destilación en seco de la materia vegetal.



### **13.2.2.1 Destilación**

Es el método tradicional para la obtención de aceites esenciales (ver Anexo 6a). Para llevarse a cabo, las plantas se exponen ya sea a agua hirviente o a vapores que liberan el aceite esencial por medio de la evaporación. El aceite se obtiene mediante un simple proceso de destilación (de donde proviene su nombre) de dos líquidos inmiscibles, en este caso, el agua y el aceite, bajo el principio de las diferencias de temperatura de ebullición permitiendo que el aceite (más ligero que el agua) flote por encima del agua y al condensarse, pueden ser fácilmente separados. (Farid, C., 2010)

### **13.2.2.2 Destilación por arrastre de vapor**

Esta técnica es una variante de la destilación, en la cual el material vegetal se coloca en un recipiente con agua y posteriormente se somete a calentamiento (ver Anexo 6b). Esta mezcla se pone en contacto con una corriente de vapor de un generador que luego arrastra la mezcla de aceite y agua a un condensador que es colectada y luego separada por centrifugación. (Soto, L., 2010)

Este método es el más utilizado para la producción de aceites esenciales a nivel industrial y dada la facilidad del método, permite que sea fácilmente reproducible a escala de laboratorio. A pesar de ser una forma eficiente de obtener el aceite, el tiempo de extracción se hace más largo, lo que produce más reacciones de hidrólisis y oxidaciones. Debido al uso de agua (solvente polar), muchas reacciones de degradación se llevan a cabo, sobre todo la formación de carbocationes, los cuales influyen en la calidad del aceite obtenido.

Además de las técnicas anteriormente mencionadas, existen numerosas variantes de los métodos de destilación que fundamentalmente tienen el mismo principio. Dichas técnicas incluyen la turbodestilación, hidrodifusión, destilación a presión reducida, destilación continua y destilación molecular. Sin embargo las detalladas son las más utilizadas y todas ellas poseen la desventaja de bajos porcentajes de rendimiento, formación de subproductos no deseados y una estabilidad limitada. (Uysal, B., et al., 2011)

### **13.2.2.3 Extracción con microondas libre de agua y solventes**

El uso de energía proveniente de microondas ha tenido un efecto positivo en varios procesos tanto de la industria química como alimenticia. Dado que las ondas son altamente selectivas por regiones de humedad, las temperaturas alcanzadas son más uniformes y los perfiles de humedad se mantienen de mejor manera, dando como resultado mayores porcentajes de rendimiento y mayor pureza de los productos. (Uysal, B., et al., 2011)

La extracción con microondas libres de agua y de solventes es un método reciente (2004) y que ofrece una alternativa ecológica, así como una forma novedosa de obtener aceites esenciales. Este tipo de extracción combina la energía de las microondas con la destilación en seco sin agregar ningún tipo de solvente (ver Anexo 6c). La energía aplicada provoca un calentamiento del agua *in situ* del material vegetal, logrando la ruptura de las glándulas y receptáculos de aceite. De esta manera, el aceite se evapora gracias al calentamiento del agua *in situ* y a través de un mecanismo de enfriamiento externo, se condensan los aceites de manera continua. (Farid, C., 2010)

Las ventajas de este método reducen el tiempo de extracción además de eliminar por completo el uso de solventes. También posee una alta eficiencia, un mayor porcentaje de rendimiento y reproducibilidad, así como un mantenimiento de las características organolépticas y de pureza del aceite esencial. (Wang, Z. et al., 2006)

### **13.2.2.4 Extracción por expresión en frío**

La extracción de aceites esenciales por expresión en frío es quizá, el método que permite la obtención de los aceites más puros y parecidos a sus características naturales. Aunque es imposible obtener un aceite con idénticas condiciones a las que hay en la naturaleza, los cambios que estos pueden sufrir por el proceso de extracción pueden llegar a minimizarse mediante la expresión en frío de los aceites.

Para emplear esta técnica (ver Anexo 6d), las cáscaras de los frutos deben removerse para ser luego sometidos a presión en una prensa de acero inoxidable y posteriormente colectados en frío. El aceite colectado es luego centrifugado para eliminar las

impurezas y luego decantado para secarse (por lo regular) en sulfato de sodio anhidro y por último almacenado. (Farid, C., 2010)

Aunque existen otras técnicas para la extracción de aceites esenciales, tales como las ondas ultrasónicas y la microextracción en fase sólida, las anteriormente mencionadas son las más populares y utilizadas debido a la calidad del aceite que se obtiene así como la facilidad de representar dichos métodos. Incluso para fines de investigación, la hidrodestilación, la expresión en frío y el uso de microondas siguen siendo los métodos más rentables y fáciles de utilizar, cada uno variando en la calidad del aceite que se obtiene, así como en el tiempo empleado para su extracción.

### **13.3 VERIFICACIÓN DE LA CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS EN GUATEMALA**

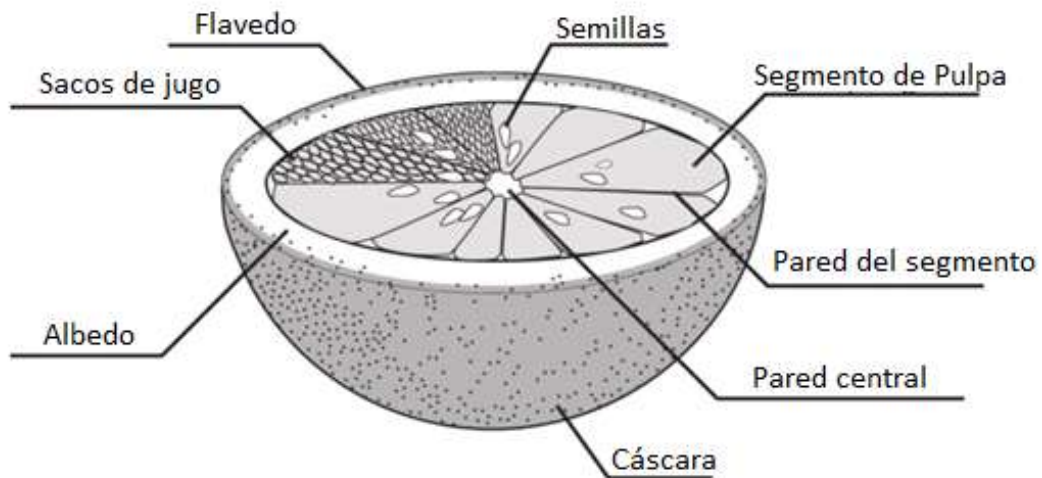
Para Guatemala el reglamento oficial y vigente encargado de verificar la calidad de los cosméticos es el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA), el cual incluye todas las características y parámetros a tomar en cuenta tanto para la elaboración, como para el control de calidad de los productos farmacéuticos que se fabriquen en el país.

En dicho reglamento, además de encontrarse todas las evaluaciones de etiquetado, pruebas físicas, químicas y organolépticas, se incluyen los criterios de control microbiológico con los que deben de cumplir los cosméticos para poder ser comercializados. (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2007)

Entre dichos parámetros se puede considerar el recuento total de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, así como la ausencia de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* dependiendo del producto a comercializar. Como ejemplo, en cosméticos, los parámetros pueden observarse en el Anexo 9. (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2007)

Habiendo discutido todas las ventajas y excelentes cualidades del aceite esencial de la cáscara de *C. paradisi* tanto como antimicrobiano como antifúngico, se considera su posible uso como antimicrobiano en preparaciones farmacéuticas siguiendo las especificaciones del Reglamento Técnico Centroamericano vigente en el país.

## ANEXO NO.2 Estructura de los frutos de cítricos



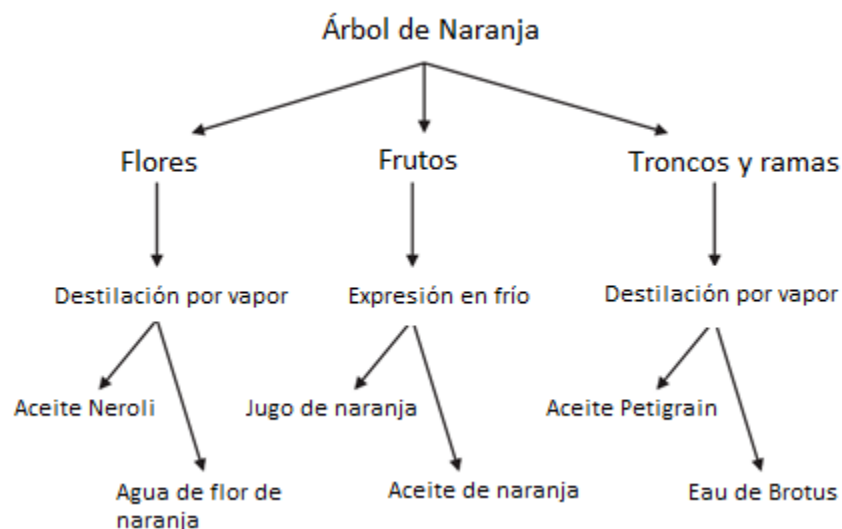
**Figura 1.** Estructura básica de los cítricos. Compuestos por: cáscara, albedo, paredes centrales, paredes del segmento, segmento de pulpa, semillas, flavedo y sacos de jugo. (Farid, C., 2010)

## ANEXO NO. 3 Frutos de toronja



**Figura 2.** Diferentes variedades y formas de las toronjas. (Lam, H. M., 2013)

#### ANEXO NO. 4 Partes de las que se extrae aceite esencial en los cítricos



**Figura 3.** Partes de la planta de donde se extrae aceite esencial en los cítricos. (Farid, C., 2010)

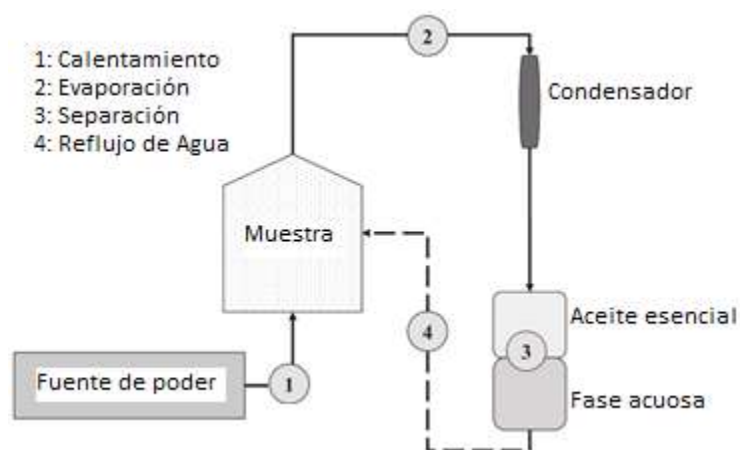
#### ANEXO NO.5 Compuestos volátiles de los frutos de cítricos

Compuestos Volátiles	Naranja (%)	Limón (%)	Bergamota (%)
Isopropanol	0,91	0,12	0,28
$\alpha$ Pineno	6,37	0,27	1,39
Limonene	88,21	78,84	72,88
Ocimene	0,00	3,85	0,00
Nonanol	0,00	0,26	0,00
Linalool	0,02	0,02	10,23
$\alpha$ terpineol	0,71	1,30	0,00
Valencene	0,00	3,34	0,00
$\alpha$ Terpinene	0,00	0,46	0,23
$\beta$ Pinene	0,00	0,02	0,14
Terpinen- 4-ol	0,00	0,00	0,00
p-Cymene	2,37	1,75	5,62
Citral	3,00	0,10	0,70

**Figura 4.** Principales componentes volátiles de los frutos cítricos. Se observa un listado general de componentes ejemplificado en 3 diferentes cítricos: naranja, limón y bergamota. (Moufida, S. & Marzouk, B., 2003)

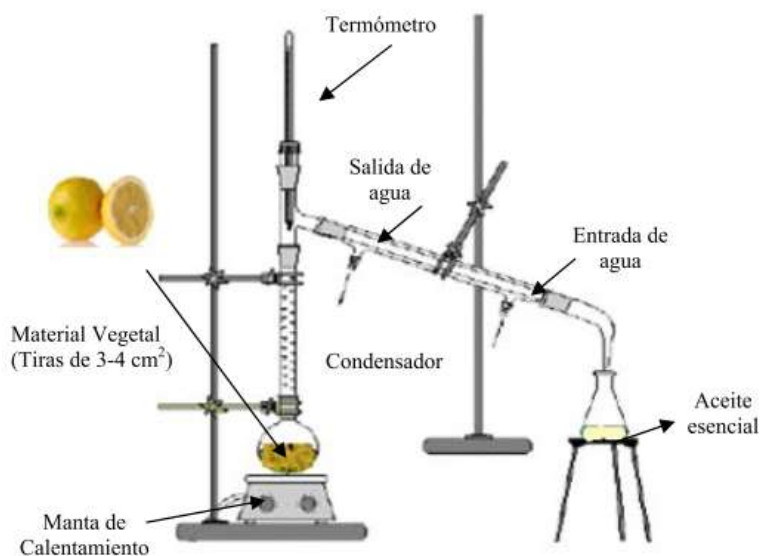
## ANEXO NO.6 Procesos de extracción de aceites esenciales

### Anexo No. 6a Destilación



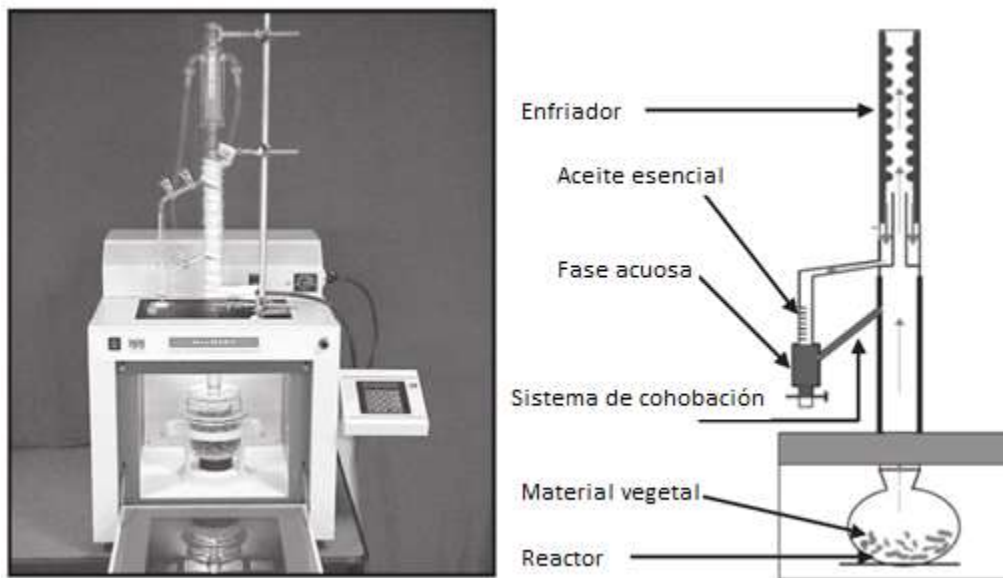
**Figura 5.** Proceso de destilación de aceites esenciales. La destilación se lleva a cabo en cuatro etapas: 1. Calentamiento, 2. Evaporación, 3. Separación y 4. Reflujo de agua. (Farid, C., 2010)

### Anexo No. 6b Destilación por arrastre por vapor



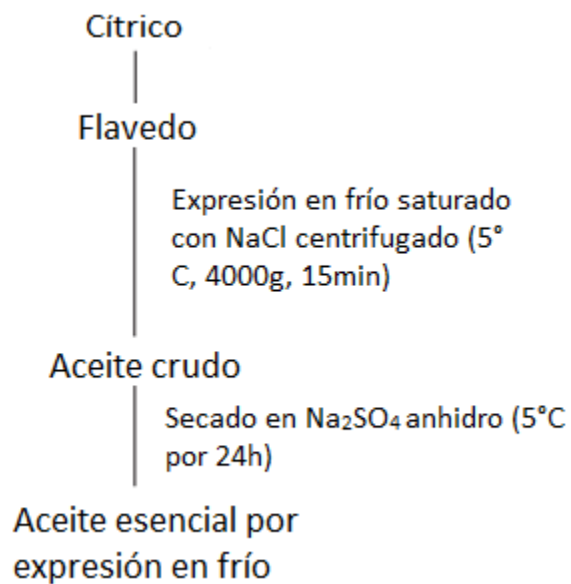
**Figura 6.** Procedimiento para destilación por arrastre de vapor. (Soto, L., 2010)

### Anexo No. 6c Extracción con microondas libre de agua y solventes



**Figura 7.** Equipo y proceso de extracción con microondas libre de agua y solventes. Al lado izquierdo se observan las partes del equipo: enfriador, aceite esencial, fase acuosa, sistema de cohobación, material vegetal y reactor. (Farid, C., 2010)

### Anexo No. 6d Técnica de expresión en frío



**Figura 8.** Técnica de expresión en frío. Expresión del flavedo del fruto con NaCl, centrifugado, obtención de aceite crudo secado en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. (Farid, C., 2010)

**ANEXO NO.7 Compuestos de cítricos con actividad antibacteriana**

**Anexo No. 7a Compuestos de aceites esenciales con actividad antibacteriana**

Componente del aceite esencial	Especies de bacteria
α - Terpineol	<i>Escherichia Coli, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes y Bacillus cereus</i>
Carvacrol	<i>E. Coli, S. typhimurium, S. aureus y L. monocytogenes</i>
Citral	<i>B. cereus, E. Coli, S. typhimurium, S. aureus y L. monocytogenes</i>
Eugenol	<i>E. Coli, S. typhimurium y L. monocytogenes</i>
Geraniol	<i>E. Coli, S. typhimurium y L. monocytogenes</i>
Perillaldehído	<i>E. Coli, S. typhimurium y L. monocytogenes</i>
Timol	<i>E. Coli, S. typhimurium, S. aureus, L. monocytogenes y B. cereus</i>

**Figura 9.** Compuestos de aceites esenciales con actividad antibacteriana sobre determinadas cepas bacterianas. (Soto, L., 2010)



## Anexo No. 7b Composición de aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L*)

**Tabla 1. Perfil GC-MS de componentes de aceite esencial de cáscara de Toronja (*Citrus paradisi*) obtenido por Hidrodestilación**

No. Pico	Componente	Tiempo de Retención (min)	Concentración (%)
1	Nonano <sup>a</sup>	5.707	0.20
2	$\alpha$ -Pinenos <sup>a</sup>	6.182	2.11
3	$\beta$ -Felandreno <sup>a</sup>	6.709	1.18
4	$\beta$ -Mirceno <sup>a</sup>	6.983	7.25
5	Octanal <sup>e</sup>	7.144	1.68
6	D-limoneno <sup>a</sup>	7.659	75.07
7	3-Careno <sup>a</sup>	7.836	0.21
8	Cis-Linalolóxido <sup>b</sup>	7.968	0.31
9	Linalool <sup>b</sup>	8.247	0.48
10	Decanal <sup>c</sup>	9.307	1.11
11	Tridecano <sup>d</sup>	10.180	0.26
12	Copaene <sup>e</sup>	10.983	0.82
13	Tetradecanod	11.075	0.47
14	Cariophyleno <sup>e</sup>	11.395	1.88
15	$\alpha$ -Cariophyleno <sup>c</sup>	11.687	0.30
16	$\delta$ -Cadineno <sup>e</sup>	12.236	0.89
17	Metilpalmitato <sup>f</sup>	16.505	0.31
18	Metiloleato <sup>f</sup>	18.410	0.19
19	Ftalato <sup>f</sup>	22.090	0.54
	Total identificado (%)		95.26
----	Otros <sup>g</sup>	Variado	4.74
	Rendimiento (%)		0.79
	Gravedad específica		0.883

<sup>a</sup>Monoterpeno, <sup>b</sup>Monoterpeno oxigenado, <sup>c</sup>Aldehído alifático, <sup>d</sup>Carbohidrato alifático, <sup>e</sup>Sesquiterpeno, <sup>f</sup>Ácido esteárico y <sup>g</sup>Otros carbohidratos no identificados

Fuente: Traducción (Okunowo, W.O., et al., 2011)

## Anexo No. 7c Actividad antibacteriana de aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi L*)

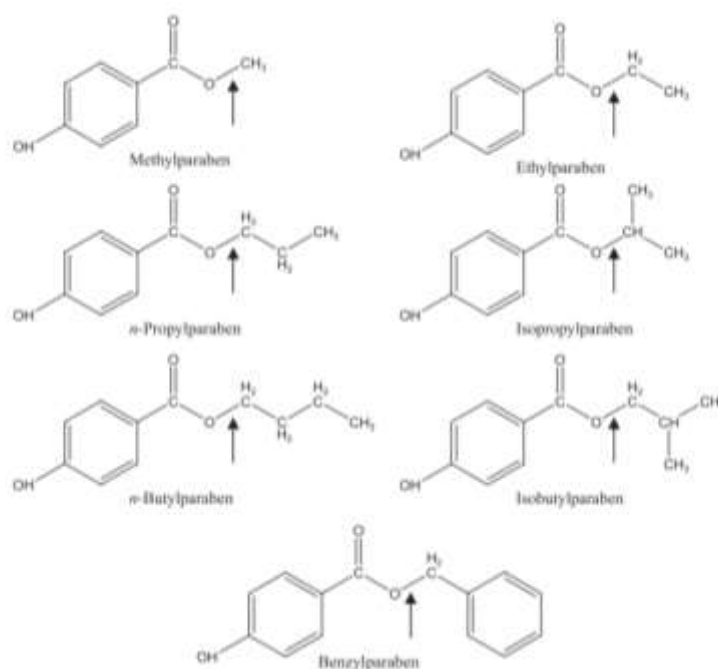
Especies bacterianas	HD	EMLAS	Control Antibiótico (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	41	53	35 (P) <sup>a</sup>
<i>Eterococcus faecalis</i> ATCC 29212	12	16	23 (VA) <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	11	17	22 (VA)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	28	30	20 (AMC) <sup>c</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	32 (MEM) <sup>d</sup>
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	13	15	20 (AMP) <sup>e</sup>
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	15	19	31 (MEM)
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	14	21	36 (FEP) <sup>f</sup>

<sup>a</sup>Penicilina, <sup>b</sup>vancomicina, <sup>c</sup>amoxicilina/ácido clavulánico 2:1, <sup>d</sup>meropenem, <sup>e</sup>ampicilina, <sup>f</sup>cefepime.

HD, hidrodestilación; EMLAS, Extracción con microondas libre de agua y solventes

Fuente: Traducción (Uysal, B., et al., 2011)

## ANEXO NO.8 Parabenos



**Figura 10.** Estructuras químicas de los 7 alquil-ésteres del ácido p-hidroxibenzoico que pueden encontrarse en diferentes productos. La hidrólisis del enlace éster (flechas) libera el metabolito de ácido p-hidroxibenzoico. (Darbre, P.D. & Harvey, P.W., 2008)

## ANEXO NO. 9 Especificaciones microbiológicas

### Anexo No. 9a Especificaciones de microorganismos patógenos

<b>MICROORGANISMO</b>	<b>ESPECIFICACIÓN</b>
Staphylococcus aureus	Ausente
Escherichia coli	Ausente
Pseudomonas aeruginosa	Ausente

Fuente: (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2007)

### Anexo No. 9b Especificaciones de límites microbianos (UFC/g o UFC/cm<sup>3</sup>)

<b>PRODUCTO</b>	<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>ESPECIFICACIÓN</b>
Para Bebé	Recuento Total de Mesófilos aerobios	$\leq 10^2$
	Recuento Total de Mohos y Levaduras	$\leq 10^2$
Para el contorno de ojos	Recuento Total de Mesófilos aerobios	no más de $5 \times 10^2$
	Recuento Total de Mohos y Levaduras	$\leq 10^2$
Todos los otros	Recuento Total de Mesófilos aerobios	$\leq 10^3$
	Recuento Total de Mohos y Levaduras	$\leq 10^2$

Fuente: (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2007)

## ANEXO NO. 10 Concentración Mínima inhibitoria

Tabla 2. CMI y CMB de componentes de aceites esenciales contra aislados clínicos de bacterias

Organismos	Citral	Limoneno	Menthone	Timol	Ciprofloxacina <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i>	1.00	0.50	0.75	2.00	0.25
<i>S. pneumoniae</i>	1.00	0.50	0.75	2.00	0.25
<i>S. typhi</i>	2.00	1.50	1.00	2.00	0.25
<i>Escherichiacoli</i>	2.00	1.50	1.00	2.00	0.25
<i>P. aeruginosa</i>	2.00	2.00	1.50	2.00	0.25
<i>S. dysenteriae</i>	2.00	2.00	2.00	2.00	0.25
<i>P. mirabilis</i>	2.00	1.50	1.00	2.00	0.25

<sup>a</sup>Control antibiótico en discos con concentraciones de 100µg; CMI- Concentración Mínima Inhibitoria, CMB- Concentración Mínima Bactericida en µg

Fuente: Traducción (Vimal, M. et. al., 2013)

## ANEXO NO. 11 Certificado de Calidad del aceite esencial de cáscara de toronja



**CERTIFICADO DE CALIDAD**

Cliente:   
 Fecha de análisis:  Producto:   
 Muestra no.  Lote:   
 Fecha de Producción:  Fecha de Expiración:

**ANALYSIS RESULTS** Temperatura:

ASSAY	METHOD*	RESULTS	SPECIFICATIONS**
Apariencia y olor	Visual	CUMPLE	Color amarillo pálido con líquido rojo, cáscara de pomelo característico olor
Gravedad específica	MA-01 Section 1.1	0.843	0.8430 to 0.8530
Rotación óptica	MA-01 Section 1.2	+94.3	+90° to +95°
Índice de refracción	MA-01 Section 1.3	1.4732	1.4700 to 1.4760
Solubilidad en etanol	MA-01 Section 1.4	2.0 ml. Etanol	Soluble en 2-3 vols al 98% etanol, puede presentar turbidez en diluciones mayores.
Cromatografía de gases	MA-02 Section 1	CUMPLE	Comparación contra cromatograma de muestra o patrones internos.

\* These assays coincide with the FCC (Food Chemical Codex) methods.  
 \*\* The above specifications are based on the EOA (Essential Oils Association).

  
 Laboratory

  
 Authorized

  
 FO-137/0

24 Avenida Calzada Atanasio Tzul 42-85, Zona 12 - CP 01012 Guatemala, Guatemala, C.A. - PHX: (502) 2204-9400 FAX: 2479-4457  
 e-mail: extract@cardamomoil.com - www.cardamomoil.com

Fuente: Aceites Esenciales Extract, Sociedad Anónima, 2015

**ANEXO NO. 12 Cromatogramas de determinación de limoneno en aceite esencial de cáscara de toronja.**

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS  
DE GUATEMALA



**USAC**  
TRICENTENARIA  
Universidad de San Carlos de Guatemala

FACULTAD DE CC.QQ. Y FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA  
"Julio Valladares Márquez"  
CENTRO DE INFORMACIÓN Y  
ASESORÍA TOXICOLÓGICA – CIAT  
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA

INFORME No.  
L.1375.08.2015 al  
L.1377.08.2015

Página: 1/1

**INFORME DE LABORATORIO  
DE TOXICOLOGIA**

SOLICITANTE: Estudiante: María Isabel Ponce  
Fac. de CC.QQ. y Farmacia

FECHA DE INGRESO: 07/08/2015

FECHA DE ENTREGA: 19/08/2015  
TIPO DE MUESTRA: Aceite esencial cascara de toronja sin solventes (Citrus paradisi L.)

ANALISIS SOLICITADO: Componentes del aceite esencial de cascara de toronja por GC/MS

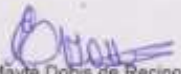
**RESULTADO:**

INFORME NUMERO	DESCRIPCION DE LA MUESTRA	FECHA DE INGRESO	RESULTADO
L.1375.08.2015	Líquido amarillento contenido en un vial de vidrio color ambar, con una etiqueta que dice "Muestra # 1 Aceite esencial cascara de toronja, aceite puro MX # 1"	07/08/2015	*
L.1376.08.2015	Líquido amarillento contenido en un vial de vidrio color ambar, con una etiqueta que dice "Muestra # 2 Aceite esencial cascara de toronja, aceite puro MX # 2"	07/08/2015	*
L.1377.08.2015	Líquido amarillento contenido en un vial de vidrio color ambar, con una etiqueta que dice "Muestra # 3 Aceite esencial cascara de toronja, aceite puro MX # 3"	07/08/2015	*

**\* SE ENTREGAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS GRABADO EN UN CD AL INTERESADO.**

Se devuelve el excedente de la muestra.

Estos resultados corresponden únicamente a la muestra tal y como se recibió.

  
Licda. Mayte Dohis de Recinos  
PROFESIONAL DE LABORATORIO II



ESTE DOCUMENTO ES VALIDO UNICAMENTE EN ORIGINAL

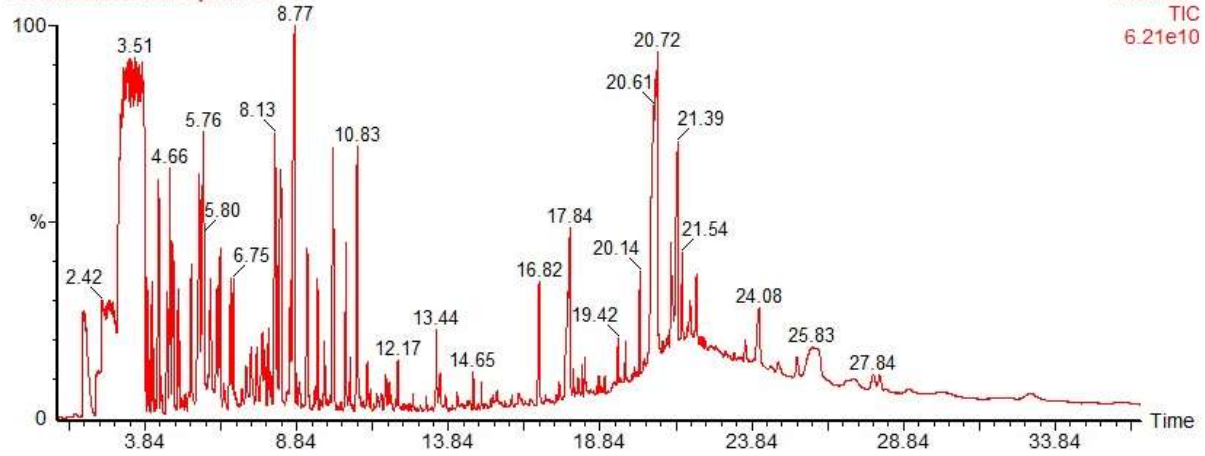
Fuente: Datos Experimentales, CIAT, 2015

1375.08.15A Ecascara toronja-limoneno- M1-2

, 10-Aug-2015 + 11:20:37

1375A Ecascara toronja M1-2

Scan EI+  
TIC  
6.21e10



**Figura 11.** Cromatograma de aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L.*) Mx1. El limoneno puede apreciarse al tiempo 4.66.

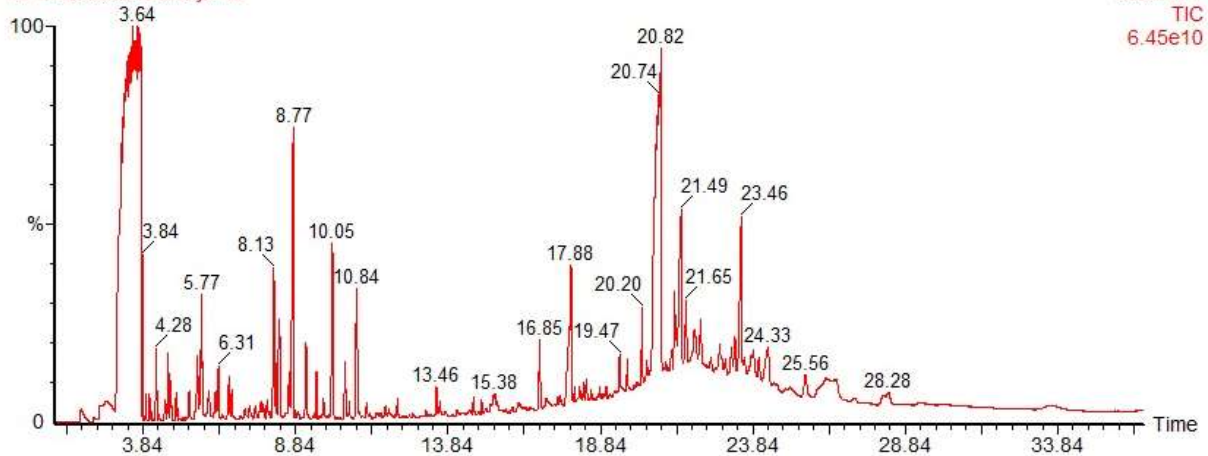
Fuente: Datos experimentales, CIAT, 2015

1377.08.15A Ecascara toronja-limoneno- M2

, 11-Aug-2015 + 09:46:39

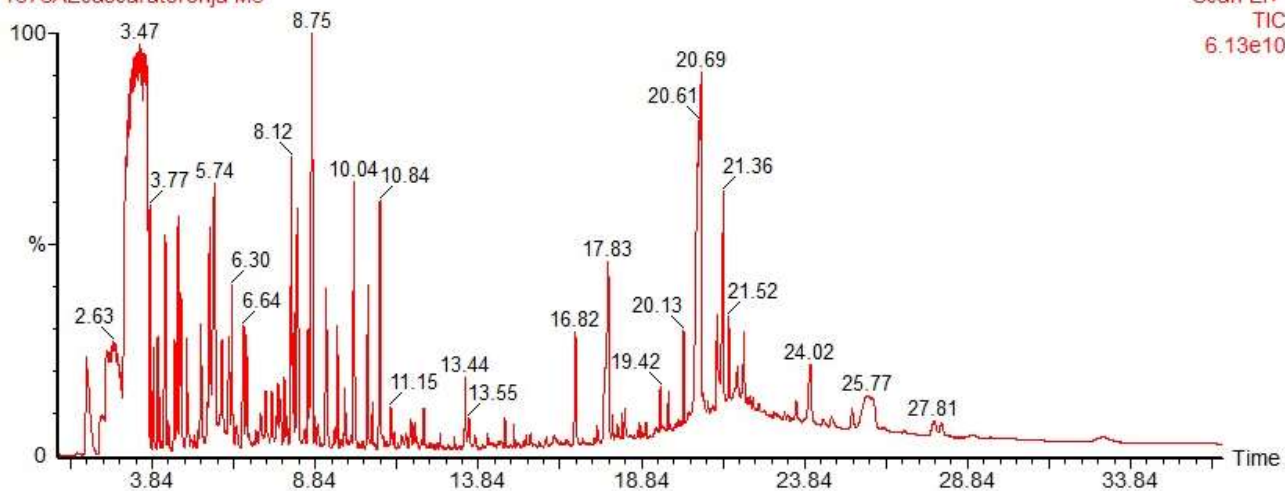
1377A Ecascara toronja M2

Scan EI+  
TIC  
6.45e10



**Figura 12.** Cromatograma de aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L.*) Mx2. El limoneno puede apreciarse al tiempo 4.72.

Fuente: Datos experimentales, CIAT, 2015



**Figura 13.** Cromatograma de aceite esencial de cáscara de toronja (*Citrus paradisi L.*) Mx2. El limoneno puede apreciarse al tiempo 4.69.

Fuente: Datos experimentales, CIAT, 2015

### ANEXO NO.13 Fórmulas finales empleadas para la elaboración de cosméticos

#### Anexo No. 13a Formulación de gel a base de carbopol con aceite esencial de cáscara de toronja como antimicrobiano

No. CAS	Materia prima	Porcentaje	Función
9002-01-4	Carbopol	0.75%	Gelificador
	Aceite esencial de cáscara de toronja	10%	Antimicrobiano
102-71-6	Trietanolamina	0.4%	Espesante
56-87-5	Glicerina	10%	Hidratante
7732-18-5	Agua	c.s.p. 100%	Vehículo

Fuente: Datos experimentales.



**Anexo No. 13b Formulación de crema con aceite esencial de cáscara de toronja como antimicrobiano**

No. CAS	Materia prima	Porcentaje	Función
8042-47-5	Parafina líquida	38%	Fase oleosa
8012-89-3	Cera de abeja	3%	Fase oleosa
1190-63-2	Espermacet	3%	Fase oleosa
123-94-4	Monoestearato de glicerilo	12%	Emulsionante
56-87-5	Glicerina	4%	Hidratante
	Aceite esencial de cáscara de toronja	10%	Preservante
7732-18-5	Agua	c.s.p. 100%	Vehículo

Fuente: Datos experimentales

**ANEXO NO.14 Halos de inhibición de formulaciones farmacéuticas**



**Figura 14.** Halos de inhibición de formulaciones farmacéuticas. En la imagen de la derecha puede apreciarse el correspondiente para la crema y en la imagen de la izquierda el correspondiente del gel.

Fuente: Datos Experimentales

---

María Isabel Ponce Ayala

Tesista

---

Lic. Julio Chinchilla

Asesor de Trabajo de Tesis

---

Licda. Lucrecia Peralta de Madriz

Revisora del Trabajo de Tesis

---

Licda. Hada Alvarado

Directora de Escuela

---

Dr. Rubén Velásquez Miranda

Decano