



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA**

**EFEECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE
ESENCIAL DE HOJAS DE *Citrus aurantifolia* (LIMÓN
PERUANO) FRENTE A *Staphylococcus aureus***

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTORA

MEDRANO GASTAÑUADI, MILAGROS DE JESÚS

ORCID: 0000-0001-8308-7399

ASESOR

SÁNCHEZ MORENO, HÉCTOR MELVIN

ORCID: 0000-0003-0970-6301

TRUJILLO – PERÚ

2019

EQUIPO DE TRABAJO

AUTORA

Medrano Gastañuadi Milagros de Jesús

ORCID: 0000-0001-8308-7399

**Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Estudiante de
Pregrado, Trujillo, Perú**

ASESOR

Sánchez Moreno, Héctor Melvin

ORCID: 0000-0003-0970-6301

**Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Facultad de
Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica,
Trujillo, Perú**

JURADO

Díaz Ortega Jorge Luis

ORCID: 0000-0002-6154-8913

Arteaga Revilla Nilda María

ORCID: 0000-0002-7897-8151

Amaya Lau Luisa Olivia

ORCID: 0000-0002-6374-8732

JURADO EVALUADOR DE TESIS

Dr. Díaz Ortega Jorge Luis

Presidente

Mgtr. Arteaga Revilla Nilda María

Miembro

Mgtr. Amaya Lau Luisa Olivia

Miembro

Mgtr. Sánchez Moreno Héctor Melvin

Asesor

AGRADECIMIENTO

A Dios, padre celestial por su infinito amor y misericordia, su sabiduría me ayudo a encaminarme en toda mi etapa universitaria.

A mis padres por su apoyo incondicional, a mi novio y a mi hija por su amor que son mi inspiración y mi motivación.

A la universidad ULADECH, por acogerme y brindarme conocimientos en mi etapa profesional.

DEDICATORIA

A mis padres Fermín y Hilda por cimentar en mí valores de responsabilidad y deseos de superación, que fueron el cimiento principal para la construcción de mi carrera profesional.

En especial mención, a mi hija Emilie que sin aún mencionar palabras por su corto periodo en esta tierra; es quien que con su sola mirada redarguye mi espíritu y crea mi fortaleza

A mi mamita María y a mis tíos Roger y Esther que han estado ahí siempre y mucho más cuando les he necesitado.

RESUMEN

El presente estudio de investigación de tipo experimental, nivel explicativo y de enfoque cuantitativo, se realizó con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano) frente a *Staphylococcus aureus*. Se trabajó con 20 placas divididas en 4 grupos de experimentación: grupo control negativo (DMSO al 10 %), grupo estándar farmacológico ampicilina (10ug /disco) y 2 grupos experimentales con 10 µl del aceite esencial de *citrus aurantifolia* (limón peruano) a concentraciones de 10% y 20%; las placas fueron incubadas a 24 horas. Mediante el método Kirby Bauer se evaluó el efecto antibacteriano. Los diámetros de halos de inhibición para el aceite esencial al 10 % fue de 11.5 ± 1.1 mm; al 20% fue de 14.6 ± 1.4 mm; para el control estándar farmacológico (ampicilina) fue de 15.9 ± 0.9 mm y control negativo 6mm respectivamente y difieren significativamente según la prueba estadística ANOVA. Al comparar con la prueba T de Student se observó que la concentración al 20 % tuvo un efecto antibacteriano significativo mayor sobre *S. aureus* en comparación con el 10 % ($P < 0,05$), en tanto el efecto antibacteriano a ambas concentraciones fue menor en comparación a ampicilina ($P < 0.05$). Se concluye que el aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano) si tiene efecto antibacteriano in vitro frente a *Staphylococcus aureus*.

Palabras claves: *Citrus aurantifolia*, efecto antibacteriano y *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

The present research study of experimental type, explanatory level and quantitative approach, was carried out with the objective of evaluating the in vitro antibacterial effect of the essential oil of *Citrus aurantifolia* leaves (Peruvian lemon) against *Staphylococcus aureus*. We worked with 20 plates divided into 4 experimental groups: negative control group (10% DMSO), standard pharmacological group ampicillin (10ug / disc) and 2 experimental groups with 10 µl of the essential oil of *Citrus aurantifolia* (Peruvian lemon) at concentrations 10% and 20%; the plates were incubated at 24 hours. The antibacterial effect was evaluated using the Kirby Bauer method. The diameters of inhibition halos for the 10% essential oil was 11.5 ± 1.1 mm; at 20% it was 14.6 ± 1.4 mm; for the pharmacological standard control (ampicillin) it was 15.9 ± 0.9 mm and negative control 6mm respectively and they differ significantly according to the ANOVA statistical test. When comparing with the Student's T test, it was observed that the 20% concentration had a significant higher antibacterial effect on *S. aureus* compared to 10% ($P < 0.05$), while the antibacterial effect at both concentrations was lower. compared to ampicillin ($P < 0.05$). It is concluded that the essential oil of *Citrus aurantifolia* leaves (Peruvian lemon) does have antibacterial effect in vitro against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: *Citrus aurantifolia*, antibacterial effect and *Staphylococcus aureus*

Contenido

AGRADECIMIENTO	ii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT.....	vi
I. INTRODUCCIÓN:.....	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA:.....	5
III. HIPÓTESIS:	14
IV. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN:	15
4.1. Diseño de la investigación:	15
4.2. Población y muestra	16
4.3. Definición y operacionalización de variable indicadores:	18
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:.....	19
4.5. Plan de Análisis:.....	21
4.6. Matriz de consistencia:.....	23
4.7. Principios Éticos:	24
V. RESULTADOS:	25
4.1. Resultados:	25
4.2. Análisis de Resultados:	27
VI. CONCLUSIONES:.....	30
ASPECTOS COMPLEMENTARIOS:	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	32
ANEXOS	38

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano) a concentraciones del 10% y 20 % frente a *S. aureus* .

TABLA 2: Comparación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano) a concentraciones 10%,20 % y ampicilina frente a *Staphylococcus aureus*.

I. INTRODUCCIÓN:

Las plantas forman un requerimiento eficaz en el mejoramiento de tratamientos de diferentes enfermedades del mundo. Sin embargo, no encuentran referencias específicas para determinar la expansión del empleo global de plantas medicinales, la Organización Mundial de Salud (OMS) ha considerado que más del 80 % de los habitantes emplea, la medicina tradicional para satisfacer sus exigencias de interés primario de salud, la totalidad de tratamientos implica el empleo de síntesis de plantas y sus sustancias activas. De acuerdo a la OMS una planta terapéutica es una variedad vegetal que incluye extractos usadas con propósitos medicinales y cuya sustancia activa sirven como indicadores para recopilación de actuales fármacos ⁽¹⁾.

El Perú posee una inmensa variedad biológica por el número de especies, recursos genéticos y diversidad de ecosistemas. Sin embargo, la intervención en el mercado mundial de productividad natural es de 0,02%. Aquí se emplean 1 400 especies con poder medicinal de empleo habitual y solo una reducida proporción de estas y sus obtenidos se distribuyen en el interior y exterior del país. El empleo de fitofármacos es una elección permitida para complementar una política de atención primaria de salud por su pequeño costo y su utilización tradicional. Primero, se debe avalar que el fitofármaco tenga la condición requerida y la efectividad auténtica ⁽²⁾.

En todas partes del mundo se viene considerando un dilema de salud pública en la sociedad, la mortalidad por enfermedades infecciones debido al fenómeno de resistencia bacteriana; teniendo como referencia en el medio hospitalario, el hábito excesivo de medicinas antibacterianos esto beneficia a cepas portadoras de resistencia contra uno o más antibióticos. Actualmente ha sido considerado un dilema la resistencia bacteriana por el incremento de bacterias patógenas multi-drogo. ⁽³⁾

Las enfermedades infecciosas en tiempos remotos; han sido tratadas con remedios tradicionales extraído de distintas hierbas. Por esta razón la OMS impulsa el estudio basado en investigaciones científicas la utilización de plantas medicinales por motivos a que abarca una gran profusión de principios activos capaz de ser eficiente para combatir el incremento de antibióticos. ⁽³⁾

Staphylococcus aureus es uno de los patógenos humanos más considerables, aparecen comprometido en diferentes infecciones e intoxicaciones, involucrando diferentes órganos del sistema. El tratamiento de estas infecciones es obstaculizado por su eminente disposición de producir la resistencia antimicrobiana ⁽³⁾.

Uno de los cultivos comercialmente valioso, que se siembra y produce a nivel mundial es el limón. La hoja de estos cítricos posee una alta gama de nutrientes, además de contener otros productos fitoquímicos; el mencionado son empleados de manera eficaz como medicamentos. La cáscara del limón es una abundante fuente de glicósidos flavonoides, cumarinas, β y γ - sitosterol, glucósidos y aceites volátiles. Asimismo, la fibra de cítricos igualmente posee compuestos bioactivos, tales como polifenoles y flavonas polimetoxilatos, que aportan a su acción antibacteriana ^(4,5).

Los aceites esenciales de cítricos, y en específico del limón, permiten ser la elección requerida tanto por sus propiedades eficaces como por ser identificados como seguros (GRAS), ya que han evidenciado poseer efectos inhibidores directos en contra de una gama de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Esto igualmente puede ser de mucho provecho en el campo de la biomedicina, en la que la inspección de enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias, se hace cada vez más complicado por la resistencia a los antibióticos ⁽⁶⁾.

La industria farmacéutica en estos últimos años luego de dedicarse únicamente a la fabricación de fármacos de síntesis, hay una variación en las investigaciones para nuevos medicamentos de origen natural; por tal motivo se realiza esta investigación experimental sobre el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano) frente a *Staphylococcus aureus*

El aumento de la resistencia bacteriana al nivel internacional y la superior constancia en la manifestación de cepa multirresistentes, transforman a este fenómeno en uno de los importantes desafíos para las cifras asistenciales de la salud pública. Las infestaciones causadas por gérmenes multirresistentes, se vinculan a la derrota de los regímenes terapéuticos con ascendientes registros de mortalidad, estadía y mayores costos ⁽⁷⁾.

Por motivo de investigar y averiguar las propiedades medicinales de plantas con fin terapéutico, consideramos que nuestro estudio busca conocer los posibles efectos antibacterianos del aceite esencial de *citrus aurantifolia* (limón peruano) en: *Staphylococcus aureus* bacterias Gram positivas, ejecutor de enfermedades infecciosas, en distintos órganos y sistemas del cuerpo; y originando en estas últimas décadas, alarma en los profesionales de salud, por el incremento en la resistencia a diferentes medicamentos, dejándonos con pocas probabilidades terapéuticas; debido a eso buscamos actuales opciones terapéuticas con plantas medicinales⁽³⁾.

Teniendo en cuenta la alta prevalencia reportada de resistencia bacteriana a nivel mundial, nacional y local; nuestro presente trabajo del efecto antibacteriano de *Citrus aurantifolia* (Limón peruano) busca hallar una opción terapéutica con plantas medicinales que sean disponibles, eficaces y económica.

Por lo tanto, planteamos el siguiente enunciado:

¿El aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (Limón peruano) presentará efecto antibacteriano in vitro frente a *Staphylococcus aureus* ?

OBJETIVOS:

Objetivo general:

- Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *citrus aurantifolia* (limón peruano) frente a *Staphylococcus aureus*.

Objetivos específicos:

- Determinar el efecto antibacteriano in vitro de las concentraciones de 10 % y 20 % del aceite esencial de hojas de *citrus aurantifolia* (limón peruano) frente a *Staphylococcus aureus*.
- Comparar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano) a concentraciones 10%,20 % y ampicilina frente a *Staphylococcus aureus*.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA:

2.1 Antecedentes:

Según Al-Aamri, et al. en el año 2018 Omán (Medio Oriente), realizó la siguiente investigación denominada “Composición química y actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* L. hojas cultivadas en el este de Omán. El aceite esencial se aisló mediante hidrodestilación Se utilizó cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) para identificar y cuantificar los componentes químicos, donde se identificaron 33 compuestos químicos, con d-limoneno (63.35%) formando el componente principal. Otros componentes importantes incluyen 3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol (7,07%), geraniol (6,23%), E-citral (4,35%), Z-citral (3,29%) y β -ocimeno. (2,25%). El aceite esencial de las hojas de *Citrus aurantifolia* L. mostró una excelente actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ⁽⁸⁾.

Según Mantilla C, en el año 2018 Perú, realizó una investigación denominada “Determinación del efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* (“tangelo”) frente a *Staphylococcus aureus* in vitro” . El Método utilizado es de tipo analítico estadístico, y de nivel descriptivo; obteniendo el aceite por destilación de arrastre de vapor utilizando concentraciones de (25%,50% y 75%) del aceite esencial del fruto de *Citrus paradisi*. Concluye que existió efecto antibacteriano en el aceite esencial del fruto del *Citrus paradisi* (“tangelo”), inhibitorio positivo a la concentración de 25% presenta mayor efecto antibacteriano, y en las concentraciones de 50% y 75%

va disminuyendo el efecto debido a la volatilidad que presenta los aceites esenciales.

(9)

Según Estrada A, en el año 2017 (Perú), realizó una investigación denominada “Efectividad Antibacteriana in vitro del aceite esencial Citrus Limón en diferentes concentraciones sobre el Streptococcus mutans, Cusco, 2017”. En el estudio se utilizó diferentes concentraciones (50%, 75% y 100%) del aceite esencial Citrus limon sobre el Streptococcus mutans. Concluyendo que al utilizar el aceite esencial Citrus limon a la concentración del 50%, su efecto antibacteriano es nula (-) frente al Streptococcus mutans, mientras que en las concentraciones utilizadas al 75% y 100% muestran diferencias estadísticas con valores muy cercanos respecto a su efecto antibacteriano

(10).

Según Pérez J, en el año 2016 Perú, realizó una investigación denominada “Efecto del agente antimicrobiano del aceite esencial de canela y aceite esencial de limón en la cobertura comestible y el tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras y aceptabilidad general en rodajas de banano (musa paradisíaca)” se propuso determinar el efecto antimicrobiano en la cobertura comestible que permita obtener la menor pérdida de peso y recuento de mohos y levaduras, y la mayor firmeza, color y aceptabilidad general en rodajas de banano alcanzando como resultado que el tratamiento de cobertura con aceite esencial de canela presentó el menor recuento de mohos y levaduras (200 ufc/g), seguido del tratamiento con cobertura de aceite esencial de limón (750 ufc/g), ambos, fueron mejores en comparación del tratamiento control (1233 ufc/g).⁽¹¹⁾

Según Da Silva A, Bolivia en el año 2015 realizó una investigación denominada “Determinación de la actividad antibacteriana de tres variedades de limón (citrus limón (l) osbeck, citrus limón (l) osbeck en combinación con citrus reticulata y citrus medica l.) Frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*” en el presente trabajo se obtuvieron el aceite esencial y macerado de la hoja, cáscara y semilla de limón dando como resultado que frente a *Staphylococcus aureus* el aceite esencial y el macerado obtenido de hoja y cáscara de las tres variedades presenta actividad antibacteriana y no de la semilla frente a *Escherichia coli* el aceite esencial obtenido de la hoja de las tres variedades presenta actividad antibacteriana, y no de la semilla. La variedad Citrus limón (L) Osbeck en combinación *Citrus reticulata* y *Citrus médica* (L) presenta actividad de la cáscara. El macerado frente a *Escherichia coli* no presenta actividad antibacteriana.⁽¹²⁾

Según Bustamante O, Delgado E. en Perú en el año 2015 realizó un estudio denominado “Efecto inhibitorio del jugo y desecado del jugo de limón *citrus aurantifolia* en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*” el trabajo presento que el jugo de limón se obtuvo por previa eliminación de la cáscara y el desecado colocando el jugo a 40°C por 7 días. El jugo se empleó a concentraciones de 10, 20 y 30% probadas durante 30, 60 y 90 min. y el desecado a 3, 6 y 9% por 5, 10 y 15 obteniendo como resultados que las cepas de E. coli, tanto para el jugo como para el desecado del jugo de limón, fueron más sensibles que S. aureus. Así mismo, existen diferencias estadísticas entre la sensibilidad de las cepas de S. aureus pero no entre la sensibilidad de las cepas de E. coli. Se concluyó que el desecado del jugo de limón tiene mayor poder de inhibición del crecimiento bacteriano que el jugo de limón⁽¹³⁾.

Según Tam M, Perú en el año 2015 realizó un estudio denominado “Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de cáscara de *citrus limon* (limón) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. 2015” tuvo como objetivo informar sobre la evaluación del efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de cáscara de Citrus limon (limón) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y compararlo con el efecto antimicrobiano de vancomicina obteniendo cuatro concentraciones del extracto etanólico; así mismo, el efecto inhibitorio promedio de la vancomicina sobre *S. aureus* meticuloso resistente corresponde a la categoría sumamente sensible finalmente llegaron a la conclusión que la Cáscara de *Citrus limon* (limón) sí tiene efecto inhibitorio in vitro sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, pero es significativamente inferior al compararlo con vancomicina ⁽¹⁴⁾.

2.2 Bases teóricas de la Investigación:

Fitoterapia:

Fitoterapia corresponde al área de la medicina alternativa, su conceptualización es la disposición de plantas o síntesis de plantas utilizadas como tratamiento con fin medicinal ⁽¹⁵⁾.

Plantas medicinales:

Comprende sustancias de origen vegetal capaz de ser empleadas con propósito terapéutico o que son procedente para la semisíntesis químico-farmacéutico ⁽¹⁵⁾.

Extracto vegetal:

Aleación compleja, con cantidad de compuestos químicos, conseguida por desarrollos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de un principio natural y útil

tecnológicamente. En este caso particular aludimos a extractos elaborados a partir a una planta con acción farmacológica ⁽¹⁶⁾.

Planta:

Citrus aurantifolia (Christm)

Definición:

Es un arbusto punzante de hoja pequeña árbol de 5 a 6 m de altura. La planta tiene tallos únicos o múltiples e irregulares ramas cubiertas con corteza lisa marrón a gris. Las ramas son cuadrangulares (cuando son jóvenes), verdes y nítidas espinas axilares de 3 a 17 mm de largo. Las hojas son amarillo-verde a verde oscuro, con pecíolos alados de 5 a 28 mm y elíptica a hojas coriáceas ovaladas de 4 a 13 cm de largo con bordes que tienen minutos redondeados dientes ⁽¹⁷⁾.

El follaje triturado tiene una fragancia y sabor fuerte, distinto, picante (cítrico). El de cuatro a cinco pétalos las flores blancas aparecen en racimos axilares de pocas flores. Los frutos son elipsoidales, de 3 a 5 cm de diámetro, tienen jugosidad, color verde verdoso carne, y son de color amarillo en la madurez. Ellos contienen algunas semillas blancas y puntiagudas de aproximadamente 1 cm de largo ⁽¹⁷⁾.

Habitad:

De estructura subespontánea en matorrales contiguo a costas y en terrenos del interior de poca y mediana altitud. Sembrado por los pobladores principalmente en sectores rurales⁽¹⁸⁾.

Descripción botánica: Según ⁽¹⁸⁾. (Anexo n°1)

Reino: *Plantae* ⁽¹⁸⁾

División: *Magnoliophyta* ⁽¹⁸⁾

Clase: *Magnoliopsida* ⁽¹⁸⁾

Subclase: *Rosidae* ⁽¹⁸⁾

Orden: *Sapindales* ⁽¹⁸⁾

Familia: *Rutaceae* ⁽¹⁸⁾

Subfamilia: *Citroideae* ⁽¹⁸⁾

Tribu: *Citreae* ⁽¹⁸⁾

Género: *Citrus* ⁽¹⁸⁾

Composición química:

Dentro de su composición contiene limoneno, quinonas, aminoácidos, taninos, fenoles, dihidroflavonoles y flavonoides (naringina, hesperidina, neohesperidina, rutina, quercetina, luteolina) ⁽¹⁹⁾.

Propiedades terapéuticas:

Citrus aurantifolia es una importante planta medicinal y alimenticia ampliamente cultivada en muchas partes del mundo. Es estimado por sus cualidades nutricionales y múltiples utilidades para la salud. La planta se usa en forma tradicional medicina como antiséptico, antiviral, antimicótico, antihelmíntico, astringente, diurético, repelente de picadura de mosquito, para el tratamiento de dolencias estomacales, estreñimiento,

dolor de cabeza, artritis, resfriados, tos, dolores de garganta y usado como estimulante del apetito. Estas utilidades para la salud de *Citrus aurantifolia* están asociados con su alta cantidades de compuestos fotoquímicos y bioactivos tales como flavonoides, limonoides, fenoles, carotenoides, minerales y vitaminas ⁽²⁰⁾.

En la investigación de Alfonso et al. 2008⁽¹⁸⁾, donde se evaluó la actuación anti edemagénica de los extractos de corteza del fruto seco de *Citrus sinensis* L. y *Citrus aurantium* L. se contempló destacada disminución de edemas en la piel de las ratas sometidas al relacionar con los controles. El periodo óptimo de cura para generar el efecto anhelado fue de 7 días.

No se ha reportado toxicidad

Bacteria: *Staphylococcus aureus*

Etiopatogenia:

Las enterotoxinas estafilocócicas (SES) son los productos de *Staphylococcus aureus* y son reconocidos como los agentes causantes del envenenamiento por alimentos clásica en seres humanos luego de la ingesta de alimentos contaminados. Mientras que la enfermedad provocada por la ingestión de la ES o de su organismo productor de alimentos contaminados son a menudo autolimitada, nuestra comprensión actual sobre el proceso de *S aureus* provoca mayor preocupación. El organismo y sus toxinas asociadas, se ha implicado en una amplia variedad de estados de enfermedad que incluyen infecciones de la piel, el corazón, los senos nasales, enfermedad inflamatoria gastrointestinal, choque tóxico, y el Síndrome de Muerte Súbita del Lactante ⁽²¹⁾.

La intrincada relación entre los diversos subconjuntos de células T inmunocompetentes y células accesorias y el material ingerido encontrado en el tracto gastrointestinal presentan retos de enormes proporciones para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica. La desregulación de los complejos equilibrios dentro de este entorno tiene el potencial de consecuencias extremas dentro del huésped, algunos de los cuales son de larga duración ⁽²¹⁾.

Mecanismos de Virulencia:

Infecciones Por Invasión:

Staphylococcus aureus, una bacteria Gram-positiva que coloniza las fosas nasales, la piel y el tracto gastrointestinal, con frecuencia invade la piel, los tejidos blandos y el torrente sanguíneo de los seres humanos. Incluso con la terapia quirúrgica y con antibióticos, las infecciones del torrente sanguíneo se asocian con una mortalidad significativa. La secreción de coagulasas, proteínas que asocian y activan el factor hemostático protrombina del huésped y la superficie bacteriana de las aglutininas, proteínas que unen la fibrina polimerizada, son estrategias clave de virulencia para la patogenia de las infecciones del torrente sanguíneo de *S. aureus*, que culminan en el establecimiento de lesiones de abscesos. ⁽²²⁾

Infecciones por acción de toxinas

Muchos factores de virulencia de *S. aureus* se pueden describir como toxinas. Las toxinas generalmente se conceptualizan como sustancias venenosas. Por lo tanto, la distinción de otros factores de virulencia (moléculas que aumentan el potencial de un patógeno para causar enfermedad en un sentido más amplio) es que son secretados por el organismo productor e interfieren directamente con el huésped. Por lo tanto, las

toxinas no incluyen moléculas que, por ejemplo, combaten el mecanismo de defensa del huésped en el espacio intracelular de la bacteria, como los mecanismos de captación de oxígeno reactivo intracelular. Además, *S. aureus* produce un gran conjunto de proteínas secretadas, unidas a la superficie que permiten que el patógeno se una al tejido del huésped ⁽²³⁾.

Infección Bacteriana

Son las infecciones y patologías provocadas por bacterias. Estos microorganismos a menudo no son observables a simple vista. Sin embargo, pueden provocar afección en el organismo ⁽²⁴⁾.

III. HIPÓTESIS:

H1: El aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano) tiene efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*.

H0: El aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano) no tiene efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*.

IV. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN:

4.1. Diseño de la investigación:

La presente investigación desarrolló un estudio de tipo experimental, nivel explicativo y de enfoque cuantitativo. Se trabajó con 4 grupos de experimentación desarrollados de la siguiente manera:

Grupo Control Negativo

Formado por 5 placas Petri conteniendo Agar Müeller Hinton (25 ml), posteriormente se sembró la bacteria *S. aureus* ATCC 25923 (1×10^8 UFC por ml) el cual se realizó utilizando como patrón el tubo 0.5 de la turbidez de Mc Farland, en ellas se colocaron por cada placa 4 discos hechos con papel Whattman 41 con un diámetro de 6 mm, sobre estos discos se colocó un solvente de dilución DMSO (Dimetil sulfóxido al 10 %), se incubaron en un tiempo de 24 horas a temperatura de 37°C, pasado el tiempo se realizó la lectura de los halos de inhibición.

Grupo Estándar Farmacológico:

Formado por 5 placas petri conteniendo Agar Müeller Hinton (25 ml), posteriormente se sembró la bacteria *S. aureus* ATCC 25923 (1×10^8 UFC por ml) el cual se realizó utilizando como patrón el tubo 0.5 de la turbidez de Mc Farland, en ellas se colocaron por cada placa 4 discos hechos con papel Whattman 41 con un diámetro de 6 mm, sobre estos discos se colocó una solución de ampicilina 10 ug, se incubaron en un tiempo de 24 horas a temperatura de 37°C, pasado el tiempo se realizó la lectura de los halos de inhibición.

Grupo Experimental 1

Formado por 5 placas petri conteniendo Agar Müeller Hinton (25 ml), posteriormente se sembró la bacteria *S. aureus* ATCC 25923 (1×10^8 UFC por ml) el cual se realizó utilizando como patrón el tubo 0.5 de la turbidez de Mc Farland, en ellas se colocaron por cada placa 4 discos hechos con papel Whattman 41 con un diámetro de 6 mm, sobre estos discos se colocó 10 µl del A.E de *citrus aurantifolia* al 10%.

Grupo Experimental 2.

Formado por 5 placas petri conteniendo Agar Müeller Hinton (25 ml), posteriormente se sembró la bacteria *S. aureus* ATCC 25923 (1×10^8 UFC por ml) el cual se realizó utilizando como patrón el tubo 0.5 de la turbidez de Mc Farland, en ellas se colocaron por cada placa 4 discos hechos con papel Whattman 41 con un diámetro de 6 mm, sobre estos discos se colocó 10 µl del A.E de *citrus aurantifolia* al 20%.

4.2. Población y muestra

Población vegetal:

Se trabajó con hojas frescas de *Citrus Aurantifolia* (limón peruano), procedente de San José distrito de Virú departamento La Libertad.

Muestra vegetal:

Se utilizó 850 g de hojas de *Citrus aurantifolia*

Criterios de inclusión:

Se utilizaron hojas de buen aspecto y color

Criterios de exclusión:

Se rechazó aquellas hojas en mal estado

Población microbiológica:

Se trabajó con cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC®25923) .

Criterios de inclusión:

Cepas de *Staphylococcus aureus* libre de contaminación.

Criterios de exclusión:

Cepas de *Staphylococcus aureus* contaminada.

4.3. Definición y operacionalización de variable indicadores:

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicadores	Escala de Medición
Variable Independiente: Aceite esencial de hojas de <i>Citrus aurantifolia</i> (limón peruano).	Compuestos volátiles de <i>Citrus aurantifolia</i> localizadas en diferentes partes de las planta.	Se utilizó dos concentraciones del A.E de <i>Citrus aurantifolia</i> .	Grupo Experimental 1: Aceite Esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> al 10% Grupo Experimental 2: Aceite Esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> al 20%	Variable cualitativa Nominal.
Variable Dependiente: Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (limón peruano) en <i>Staphylococcus aureus</i> .	Capacidad de una sustancia química que procede sobre un microorganismo para destruir o inhibir su crecimiento.	Se determinó por medio de la medición de halos de inhibición.	Para determinar el efecto antibacteriano se midió los halos de inhibición de crecimiento de todos los grupos en milímetros (mm).	Variable Cuantitativa de razón.

4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

Obtención del aceite esencial:

Para la preparación del aceite esencial se utilizó el método de destilación por arrastre de vapor de agua, en el cual se colocó en el balón Clevenger los 850g de hojas frescas cortadas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano) y se agregó 2000 ml de agua destilada, se conectó el equipo para su funcionamiento y finalmente se calentó hasta punto de ebullición durante 3h. El procedimiento se realizó 2 veces seguidas. Obteniendo un rendimiento total de 2 ml de A.E y se guardó en un frasco ámbar ⁽⁹⁾.

El porcentaje de rendimiento de pureza es 0.23% del aceite esencial obtenido mediante ml del aceite esencial sobre peso en gramo del material vegetal por 100.

Dilución del Dimetil Sulfóxido (DMSO) al 10 %:

Preparación para 5 ml: Se utilizó 500 ul de DMSO más 4500 ul de agua destilada

Diluciones de las concentraciones del aceite esencial:

Las 2 diluciones se igualaron a 1ml: para obtener la concentración de 10 % (900 ul de DMSO al 10% + 100 ul de A.E de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano)). Para la concentración de 20 % (800 ul de DMSO al 10% + 200 ul de A.E de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano)).

Activación de la cepa de *Staphylococcus aureus*

Para la activación *Staphylococcus aureus* ATCC®25923, se procedió a la esterilización del ambiente, se empezó abriendo el vial de plástico que le servía como protección, el cual contenía *Staphylococcus aureus*, un fluido de hidratación y un hisopo estéril. Se procedió a romper el fluido de hidratación, luego se hizo la

homogenización de la cepa *Staphylococcus aureus* con el fluido para poder activarlas (25).

Una vez activada la cepa de *Staphylococcus aureus*, se realizó el sembrado en placas Petri en cultivo agar tripacasa soya que fue indicado dentro del manual de activación de cepas bacterianas del INS, el sembrado se realizó con hisopo estéril, colocamos las placas Petri en la incubadora por 24 horas a una temperatura de 35°C a 37°C logrando el crecimiento bacteriano (25).

Preparación del medio de cultivo:

Para la siembra y prueba de sensibilidad, se utilizó Agar Müeller-Hinton, que es el medio adecuado para el desarrollo de *Staphylococcus aureus*. Para ello se diluyo 200 ml de Agar Müeller-Hinton marca Biolabtest frasco x 100 ml, en baño maría entre 45°-50°C. A continuación, se procedió a distribuir 10 ml en las placas Petri, se dejó enfriar.(25)

Preparación del inóculo:

Método directo de inoculación a partir de colonias aisladas de una placa de cultivo incubada por 18-24 horas, con ayuda de un hisopo estéril, se seleccionan colonias y se prepara una suspensión directa en solución salina. La suspensión debe ser inmediatamente ajustada a la escala 0.5 de Mc. Farland.(25)

Sembrado de las Placas Petri:

Luego de realizar el ajuste de turbidez del inóculo, se sumergió un asa bacteriológica, previamente esterilizada, en la suspensión, por encima del nivel del líquido. Se procedió a inocular la superficie seca de la placa con agar Müller-Hinton, estriando

con el asa bacteriológica en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Luego se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido. ⁽²⁵⁾

Aplicación de los discos:

Con cuidado se colocaron los discos con 10µl del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* al 10% y 20% uniformemente sobre la superficie del agar con ayuda de una pinza estéril, procurando asegurar el contacto completo del disco con el agar. ⁽²⁵⁾

Incubación:

Las placas se colocaron en posición invertida a 35°C para su incubación, durante 24 horas. Seguidamente se prosiguió con la medición y lectura (de los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco ⁽²⁵⁾.

Lectura de los 4 grupos de experimentación:

Se realizó mediante observación directa de los resultados de la experimentación. Para la lectura de los halos de inhibición se utilizó una regla milimétrica para medir los diámetros de la zona de inhibición, se procedió a recolectar los datos en una tabla las cuales se procesaron estadísticamente ⁽²⁵⁾.

4.5. Plan de Análisis:

Para el análisis y tabulación de datos recolectados se utilizó el programa Excel 2013 los cuales serán procesados a través del paquete estadístico IBM-SPSS-versión 22.0 Microsoft Excel. Donde se encuentran las pruebas estadísticas T-Student para dos grupos y el análisis de varianza Anova para la comparación de varios grupos (grado

de confianza 95% - $\alpha \leq 0.5$). Los resultados que se obtuvieron de los grupos de estudios serán presentados en tablas.

4.6. Matriz de consistencia:

Título de la investigación	Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis	Tipo de investigación y diseño	Variable	Definición operacional	Indicadores y escala de medición	Plan de análisis
Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de <i>Citrus aurantifolia</i> (limón peruano) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	¿El aceite esencial de hojas de <i>Citrus aurantifolia</i> (limón peruano) presentará efecto antibacteriano in vitro frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ?	<p>Objetivo general:</p> <p>-Determinar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de <i>Citrus aurantifolia</i> (limón peruano) frente a <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>Objetivos específicos:</p> <p>-Evaluar el efecto antibacteriano in vitro de las concentraciones de 10 y 20 % del aceite esencial de hojas de <i>Citrus aurantifolia</i> (limón peruano) frente a <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>-Comparar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de <i>Citrus aurantifolia</i> (limón peruano) a concentraciones 10%, 20 % y ampicilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>H1: El aceite esencial de hojas de <i>Citrus aurantifolia</i> (limón peruano) si tiene efecto antibacteriano frente a <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>H0: El aceite esencial de hojas de <i>Citrus aurantifolia</i> (limón peruano) no tiene efecto antibacteriano frente a <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Tipo: Experimental.</p> <p>Nivel: explicativo</p> <p>Enfoque: cuantitativo.</p>	<p>Variable independiente</p> <p>Aceite esencial de hojas de <i>Citrus aurantifolia</i> (limón peruano)</p> <p>Variable Dependiente</p> <p>Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (limón peruano) en <i>Staphylococcus Aureus</i></p>	<p>Concentraciones Del A.E de <i>Citrus aurantifolia</i> de 10 y 20 %.</p> <p>Se determinó por medio de la medición de halos de inhibición</p>	<p>Dos concentraciones de 10 y 20 % v/v.</p> <p>Variable cualitativo nominal</p> <p>Milímetro (mm)</p> <p>Variable cuantitativa de razón</p>	<p>Prueba estadística ANOVA y T STUDENT</p>

4.7.Principios Éticos:

La presente investigación considero los siguientes principios éticos que dirige la actividad investigadora de la UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES DE CHIMBOTE:

PROTECCIÓN A LAS PERSONAS:

En toda investigación científica donde se requiere el apoyo o participación de un ser humano; el investigador debe de respetar la identidad, diversidad, confidencialidad, privacidad que son principios fundamentales que velan por la integridad y protección del ser humano ⁽²⁶⁾.

JUSTICIA:

El investigador debe actuar con juicio razonable y debe tener la cautela necesaria para garantizar que sus capacidades y conocimientos garanticen las practicas justas ⁽²⁶⁾.

V. RESULTADOS:

4.1. Resultados:

Tabla 1: Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano) a concentraciones del 10 y 20 % frente a *S. aureus*.

<i>Grupos de Investigación</i>	<i>Halos de inhibición del crecimiento de S. aureus (mm)± Desviación Estándar</i>	Significancia Valor p*
<i>Control Negativo (Solución DMSO)</i>	6.0±0.0	
<i>Ampicilina (10ug/disco)</i>	15.9±0.9	0.000*
<i>A.E. de C. aurantifolia al 10%</i>	11.5±1.1	
<i>A.E. de C. aurantifolia al 20%</i>	14.6±1.4	

*P=0.000 < 0.05. Son estadísticamente significativos, se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula; **PRUEBA ANOVA**

A.E: aceite esencial

Tabla 2: Comparación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano) a concentraciones 10%,20 % y ampicilina frente a *Staphylococcus aureus*.

<i>Grupos de Investigación</i>	<i>Halos de inhibición del crecimiento de S. aureus (mm)± Desviación Estándar</i>	<i>T-Student</i>	<i>Significancia (P)*</i>
<i>Ampicilina 10µg vs A.E. de C. aurantifolia al 10%</i>	<i>6.0±0.0</i>	<i>13.94</i>	<i>0.000</i>
<i>Ampicilina 10µg vs A.E. de C. aurantifolia al 20%</i>	<i>15.9±0.9</i>	<i>4.58</i>	<i>0.000</i>
<i>A.E. de C. aurantifolia al 10% vs A.E. de C. aurantifolia al 20%</i>	<i>11.5±1.1</i>	<i>10.59</i>	<i>0.000</i>

***Prueba T-Student** para muestras independientes (p < 0.05)

A.E: aceite esencial

4.2. Análisis de Resultados:

El presente trabajo de investigación de tipo experimental, nivel explicativo y de enfoque cuantitativo, se realizó con el fin de demostrar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Citrus Aurantifolia* (limon peruano) frente a *S. aureus*, muestran los siguientes resultados:

Se observó los promedios \pm desviación estándar de halos de inhibición de los grupos experimentales Exp01 y Exp 02 fueron de 11.5 ± 1.1 mm. y 14.6 ± 1.4 mm, en el caso del grupo estándar farmacológico (Sensidiscos de Ampicilina 10ug/disco) es de 15.9 ± 0.9 mm. este valor concuerda con lo reportado para este fármaco por el Instituto Nacional de Salud (INS) donde para ser considerado sensible el cultivo debe tener un rango de inhibición a partir de 16mm que en este caso se encuentra en el rango ⁽¹⁴⁾.(Anexo n°3)

En la TABLA 1 se observa que la prueba ANOVA para comparar los grupos indican un nivel de significancia de 0.000, es decir el Valor P es menor que el alfa (0.000) indicando que existe una diferencia estadística altamente significativa en los resultados obtenidos entre los grupos de experimentación. Se acepta la hipótesis alternativa de la investigación: El aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano) si tiene efecto antibacteriano en *Staphylococcus aureus*.

En la TABLA 2 se presento las comparaciones entre grupos utilizando la prueba T – Student; a las 24 horas siendo el valor P = 0.000 para la comparación entre Ampicilina (10ug/disco) vs A.E. de *C. aurantifolia* al 10%; Valor P=0.002 en la comparación entre Ampicilina (10ug/disco) y A.E. de *C. aurantifolia* al 20% y P = 0.000 entre la comparación A.E. de *C. aurantifolia* al 10% vs A.E. de *C. aurantifolia* al 20%. Estos resultados indican que el aceite esencial mostraría un mayor efecto antibacteriano en

Dosis Dependiente, además se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre el fármaco ampicilina y el aceite esencial en ambas dosis siendo el fármaco el que tuvo halos de inhibición más grandes, a pesar de haber inhibición bacteriana por parte del aceite esencial.

Segun Hoerr V y Nairi V et al. en sus estudios refieren que la ampicilina es un antibiótico de penicilina beta-lactámica usado en el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por organismos susceptibles, generalmente grampositivos. El nombre "penicilina" puede referirse a varias variantes de la penicilina disponibles, o al grupo de antibióticos derivados de las penicilinas. La ampicilina tiene actividad *in vitro* contra bacterias aerobias y anaerobias grampositivas y gramnegativas. La actividad bactericida de la ampicilina resulta de la inhibición de la síntesis de la pared celular y está mediada a través de la unión de la ampicilina a las proteínas de unión a la penicilina (PBP). La ampicilina es estable frente a la hidrólisis por una variedad de beta-lactamasas, incluidas las penicilinasas, y las cefalosporinasas y las betalactamasas de espectro extendid ^(27,28).

Al unirse a proteínas específicas de unión a penicilina (PBP) ubicadas dentro de la pared celular bacteriana, la ampicilina inhibe la tercera y última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. La lisis celular es luego mediada por enzimas autolíticas de la pared celular bacteriana, tales como las autolisinas; es posible que la ampicilina interfiera con un inhibidor de la autolisina ⁽²⁹⁾.

En el estudio de Sanei-Dehkordi et al. indica los metabolitos reportados en *C. aurantifolia* incluyen los flavonoides, alcaloides, limonoides, cumarinas, carotenoides, ácidos fenólicos y aceites esenciales, son de vital importancia para la salud humana debido a sus propiedades activas. Los aceites esenciales están compuestos por una

mezcla de terpenoides entre los que destacan D_l-limoneno (94.81%), β-mirceno (1%) y α-pineno (0.65%) ⁽³⁰⁾.

Según Al-Aamri, et al. en el año 2018 expone que los aceites esenciales ejercen actividad antibacteriana, debido a su naturaleza lipofílica, los aceites esenciales pueden interactuar y alterar la permeabilidad de la membrana celular en los microorganismos, eventualmente que conduce a la muerte del microorganismo. El espectro antimicrobiano de un aceite volátil depende invariablemente de su composición química. En el presente estudio, se descubrió que el d-limoneno es el componente químico principal del aceite de cítricos, lo que contribuye a su fuerte aroma y a sus acciones antibacterianas. Los resultados del análisis de la actividad antibacteriana indican que el aceite esencial ejerce una actividad dependiente de la dosis con efectos más pronunciados contra *S. aureus* ⁽⁸⁾.

Asimismo, otros estudios indican que los componentes metabólicos presente en el A. Esencial de los citrus como son los terpenos presentan el mecanismo de acción de romper y penetrar la estructura lipídica de la pared celular de la bacteria, conduciendo a la desnaturalización de las proteínas y destrucción de la membrana celular permitiendo la salida del citoplasma, lisis celular y eventualmente muerte celular ⁽³¹⁾.

VI. CONCLUSIONES:

- Se determinó que el aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano) frente a *Staphylococcus aureus* presentó efecto antibacteriano in vitro en las concentraciones de 10% y 20 %.
- Se comparó que el aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (limón peruano) a concentración de 20% presentó un efecto antibacteriano significativamente mayor frente a *S.aureus* comparando con la concentración de 10 %, mientras que el efecto antibacteriano a ambas concentraciones fueron menor en comparaciones a ampicilina.

ASPECTOS COMPLEMENTARIOS:

- Dicha investigación motiva y sugiere a continuar con nuevos estudios científicos relacionados a efecto antibacteriano del aceite esencial de hojas de *Citrus auratifolia* (Limón peruano) en diferentes concentraciones específicas que potencie su efecto y mecanismo sobre diferentes microorganismos con el fin de mejorar la calidad de vida de la población.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Arab L. Editorial. Public Health Nutrition. [Online] Cambridge University Press; 2000; 3(2): 111-111.[Citado 16 de Mayo 2017].Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/journals/microscopy-andmicroanalysis/article/comprehensive-comparison-of-various-techniques-for-the-analysis-of-elemental-distributions-in-thin-films/60C06FDCF80DE251338525C97F17559B>
2. Organización Mundial de la Salud. Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Centro de Prensa.
3. Tong S, Davis J, Eichenberger E, Holland T, Fowler V. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. Clinical Microbiology Reviews. 2015; 28(3):603-661.[Citado 17 de Mayo 2017].Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26016486>
4. Domínguez E, Cortés V, Avila R, Olvera L, Vernon J, Bosquez E, Domínguez J. Aumento de la vida postcosecha del limón mexicano (*Citrus aurantifolia* swingle) producido en apatzingán, mich., mediante el uso de recubrimientos naturales a diferentes temperaturas de almacenamiento. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. [Internet]. 2003; 5(2):128-133.[Citado 17 de Mayo 2017].Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/813/81350210.pdf>
5. Ojito K, Herrera Y, Vega N, Portal O. Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de Citrus spp. (Rutaceae). Rev Cubana Plant Med [Internet]. 2012; 17(4): 368-379. .[Citado 18 de Mayo 2017].Disponible:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962012000400008&lng=es.

6. Aibinu I, Adenipekun T, Adelowotan T, Ogunsanya T, Odugbemi T. Evaluation of the Antimicrobial Properties of Different Parts of Citrus Aurantifolia (Lime Fruit) as Used Locally. African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines. 2007; 4(2):185-190. [Citado 19 de Mayo 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2816438/>
7. Janati A, Hosseiny M, Gouya M, Moradi G, Ghaderi E. Communicable Disease Reporting Systems in the World: A Systematic Review Article. Iranian Journal of Public Health. 2015; 44(11): 1453-1465. [Citado 2 de Junio 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4703224/>
8. Al-Aamri M, Al-Abousi N, Al-Jabri S, Alam T, Khan S. Composición química y actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro del aceite esencial de Citrus aurantifolia L. hojas cultivadas en el este de Omán. Rev.Food Science and Technology [Internet].2018. [Citado 24 de Octubre 2019]; 13 (2): 108-112. Disponible:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1658361218300027>
9. Mantilla C. “Determinación del efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto Citrus paradisi (“tangelo”) frente a Staphylococcus aureus in vitro”[Internet]. Perú: Universidad Alas Peruanas. Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud. 2018.[Citado el 24 de Octubre de 2019]Disponible en: <http://repositorio.uap.edu.pe/handle/uap/6925>
10. Estrada A, Efectividad antibacteriana in vitro del aceite esencial Citrus Limón en diferentes concentraciones sobre el Streptococcus Mutans, Cusco, 2017.[Internet].Perú: Universidad Andina del Cuzco. Facultad de Ciencias de la Salud. 2017. [Citado el 25 de Octubre de 2019]. Disponible en: <http://repositorio.uandina.edu.pe/handle/UAC/1409>.

11. Perez J. Efecto del agente antimicrobiano del aceite esencial de canela y aceite esencial de limón en la cobertura comestible y el tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras y aceptabilidad general en rodajas de banano (*musa paradisíaca*). [tesis de grado de bachiller]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2016.[Citado 14 de Agosto 2018]. Disponible en: <http://repositorio.upao.edu.pe/handle/upaorep/2469>
12. Da Silva A. Determinación de la actividad antibacteriana de tres variedades de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck, *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación con *Citrus reticulata* y *Citrus medica* L.) Frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*¹. *Univ. Cienc. Soc.* [en línea]. 2015; (14): 30-38.[Citado 18 de Junio 2017].Disponible en:http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S8888-88882015000100006&lng=es.
13. Bustamante O, Delgado E. Efecto inhibitorio del jugo y desecado del limón *citrus aurantifolia* en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. [tesis]. Chiclayo: Universidad Señor de Sipan; 2015.[Citado 9 de Octubre 2018].Disponible:<http://revistas.uss.edu.pe/index.php/tzh/article/view/187/186>
14. Tam M. Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de cáscara de citrus limon (limón) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. 2015. [tesis de grado de bachiller]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2015. [Citado 19 de Junio 2017].Disponible en:<http://repositorio.upao.edu.pe/handle/upaorep/1710>
15. Avello M, Cisternas I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev. méd. Chile* [online]. 2010, 138(10): 1288-1293. [Citado 12 de

Junio2017]. Disponible: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003498872010001100014&lng=es&nrm=iso>. ISSN00349887.

16. Organización Mundial de la Salud (OMS). Medicina tradicional: definiciones.2017.
17. Apraj V, Thakur N, Bhagwat A, Mallya R, Sawant L , Pandita N. Pharmacognostic and Phytochemical Evaluation of Citrus aurantifolia (Christm) Swingle PEEL. [internet]. Pharmacognosy Journal. October 2011. [Citado 12 Julio 2018]. Disponible en: [https:// pdfs.semanticscholar. org/e248/2a85d955c16d21cf8e1035cde5b4b40bce8c.pdf](https://pdfs.semanticscholar.org/e248/2a85d955c16d21cf8e1035cde5b4b40bce8c.pdf)
18. Mostacero J, Mejia F, Gamarra G. Taxonomía de los fanerógamos útiles del Perú. Editorial CONCYTEC; 2002.
19. Tenorio M. Flavonoides extraídos de la cáscara de naranja tangelo (Citrus reticulata x Citrus paradisi) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal sacha inchi (Plukenetia volubilis). Scientia Agropecuaria. 2016; 7(4):419-431.[Citado 13 Julio 2017]. Disponible en: [http:// revistas. unitru. edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/1265](http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/1265)
20. Onyilofe S, Ibukun O, Madu S, Isaiah S, Mohammed M, Suleiman F. Ethnomedical Importance of Citrus Aurantifolia (Christm) Swingle [Internet]. The Pharma Innovation Journal 2015; 4 (8): 01-06. [Citado 13 Julio 2018]. Disponible en: [http:// www. thepharm ajournal. com/vol4Is sue8/Issue_ Oct_2015/4-7-11.1.pdf](http://www.thepharmajournal.com/vol4Isue8/Issue_Oct_2015/4-7-11.1.pdf)
21. Valiente M, García M, García G, Sánchez D, Duperon D, Lemus R. Acción antiedemagénica de los extractos de corteza del fruto de Citrus sinensis L. y Citrus aurantiun L. en modelo de hiperpermeabilidad vascular en ratas. Rev Cubana Plant Med.[Internet]. 2008; 13(4).[Citado 16 Junio 2017]. Disponible

en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400004

22. Principato M, Qian B. Staphylococcal enterotoxins in the Etiopathogenesis of Mucosal Autoimmunity within the Gastrointestinal Tract. *Toxins*. 2014;6(5):1471-1489. [Citado 16 Junio 2017]. Disponible en:<http://www.mdpi.com/2072-6651/6/5/1471>
23. Lena T, Olaf S, Dominique M. Pathogenesis of Staphylococcus aureus Bloodstream Infections.[Internet]. *Annu Rev Pathol*. 2016; 11: 343–364.[Citado 13 Julio 2018].Disponible en:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5068359/>
24. Michael O. Staphylococcus aureus toxins. [Internet]. *Curr Opin Microbiol*.2014;0: 32–37. [Citado 13 Julio 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3942668/>
25. Sacsquispe R, Velásquez J. Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. Instituto Nacional de Salud. [Internet]. Lima 2002. [Citado el 24 junio del 2017]. Disponible:<http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>
26. ULADECH. Código de ética para la investigación. Versión 001. Consejo universitario con resolución N° 0108-2016-CU-Uladech. [Internet]. 2016 [Citado 25 de Octubre, 2019]. Disponible en: <https://www.uladech.edu.pe/images/stories/universidad/documentos/2016/codigo-de-etica-para-la-investigacion-v001.pdf>
27. Hoerr V, Duggan G, Zbytnuik L, Poon K, Große C, Neugebauer U. et. al. Characterization and prediction of the mechanism of action of antibiotics

- through NMR metabolomics. *BMC Microbiol* [Internet]. 2016 Dec 10 [Citado 2019 Jul 1];16(1):82.Disponible en: [https:// www. ncbi.nlm. nih.gov/ pubmed /27159970](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27159970)
28. Nairi V, Medda L, Monduzzi M, Salis A. Adsorption and release of ampicillin antibiotic from ordered mesoporous silica. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2019 Jul 1];497:217–25.Disponible en :[https://www. sciencedirect.com/science/article/pii/S002197971730262X](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002197971730262X)
29. Lorenzo MP, Kidd JM, Jenkins SG, Nicolau DP, Housman ST. In vitro activity of ampicillin and ceftriaxone against ampicillin-susceptible *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2019 May 3 [Citado 1 Jul 2019]; Disponible en : [https :// academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10. 1 093/ jac/dkz 173 /5485296](https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkz173/5485296)
30. Sanei-Dehkordi A, Sedaghat M, Vatandoost H, Abai M. Chemical Compositions of the Peel Essential Oil of *Citrus aurantium* and Its Natural Larvicidal Activity against the Malaria Vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) in Comparison with *Citrus paradisi*. *J Arthropod Borne Dis* [Internet]. 2016 Dec [Citado 30 de Octubre 2019];10(4):577–85.Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28032110>
31. Montero Y, Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón persa (*Círus latífoüa Tanaka*) [Internet]. México: Universidad Veracruzana. Instituto de Ciencias Básicas.2009. [Citado el 30 de Octubre 2019].Disponible:[https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46805/ MonteroCelisYanina.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46805/MonteroCelisYanina.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

ANEXOS

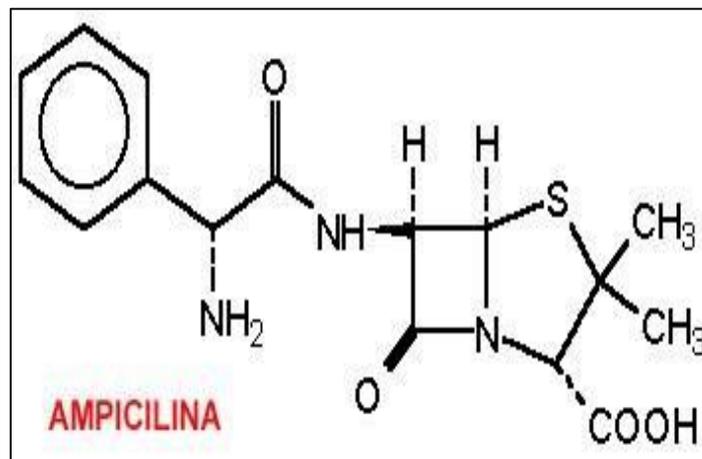
ANEXO N°1

Certificación de la Planta *Citrus Aurantifolia* (Limón peruano)



ANEXO N°2

Estructura química de la Ampicilina



ANEXO N°3

Límites aceptables (mm) de los Diámetros de los Halos de Inhibición–

Límites de Control en Pruebas de Disco Difusión

Antibióticos y Diámetros Críticos para Staphylococcus aureus

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN MM		
		R	I	S
PENICILINAS				
Ampicilina	10 µg	£ 16	-	³ 17
GLICOPEPTIDOS				
Vancomicina	30 µg	£ 14	15-16	³ 17
Teicoplanina	30 µg	£ 10	11-13	³ 14
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	120 µg	6	7 – 9	³ 10
Estreptomina	300 µg	6	7 – 9	³ 10
FLUOROQUINOLONAS				
Ciprofloxacina	5 µg	£ 15	16-20	³ 21
Levofloxacina	5 µg	£ 13	14-16	³ 17
Norfloxacina	10 µg	£12	13-16	³ 17
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30 µg	£14	15-18	³ 19
MACROLIDOS				
Eritromicina	15 µg	£ 13	14-22	³ 23
OTROS				
Rifampicina	5 µg	£ 16	17-19	³ 20
Nitrofurantoína	300 µg	£ 14	15-16	³ 17

ANEXO N°4

Lectura de las placas e interpretación de los resultados

1. Medir los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla o calibrador. Se debe mantener iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro. Tener la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto de paralelismo. En los medios suplementados con sangre, las zonas son medidas en la parte superior de la superficie del agar y retirando la tapa. Tener cuidado de no medir la zona de la hemólisis sino la de inhibición del crecimiento.
2. Para *Staphylococcus* spp o *Enterococcus* spp, usar luz transmitida, manteniendo la placa arriba de la luz para examinar un posible ligero crecimiento de cepas resistentes a Oxacilina/Meticilina o Vancomicina dentro de los halos aparentes de inhibición. Cualquier desarrollo dentro de la zona de inhibición es indicativo de resistencia a Meticilina (Oxacilina) o Vancomicina.
3. El punto final debe tomarse como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona. Sin embargo, las colonias mayores creciendo dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, reidentificadas y reensayadas. Algunos *Proteus* spp, debido a su gran movilidad, pueden presentar un velo de invasión o “swarming” dentro de las zonas de inhibición de algunos antibióticos. En estos casos el velo del swarming debe ser ignorado al momento de medir los halos de inhibición
4. Cuando se prueban discos de Cotrimoxazol puede arrastrarse sustancias antagónicas que producen un crecimiento con aspecto de niebla dentro de la zona del halo de inhibición, en estos casos no considerar en la lectura un crecimiento del 20% o menos del desarrollo total.
5. Los diámetros de inhibición son interpretados basándose en las tablas. La sensibilidad de la cepa bacteriana será reportada como sensible (S), intermedio (I), o resistente (R).

ANEXO N°5

Recolección de las hojas del limón peruano.



Obtención del aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia*



ANEXO 6:

Cultivo y revisión de halos de inhibición de los 4 grupos de experimentación.

