

**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**“EFECTO INHIBITORIO *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO  
DE CÁSCARA DE *CITRUS LIMON* (LIMÓN) SOBRE  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO RESISTENTE. 2015”.**

**PROYECTO DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE MÉDICO  
CIRUJANO**

**AUTORA:  
MÓNICA JANET TAM BURGA**

**ASESORA:  
DRA. ELVA MEJÍA DELGADO**

**TRUJILLO- PERÚ**

**2015**



**JURADO**

**PRESIDENTE: DR. MARCO ZÁRATE ARCE**

**SECRETARIO: DR. GALO ARÉVALO BENITES**

**VOCAL: DR. JULIO MANAY BARRERA**

**ASESORA:**

**DRA. ELVA MEJÍA DELGADO**

## DEDICATORIA

*Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento:*

*Papá y mamá.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A DIOS por darme paciencia, perseverancia y poner en mi camino a amigos solidarios quienes me apoyaron a cumplir con este trabajo.*

*A MIS PADRES Y HERMANOS por su apoyo incondicional.*

*A mi ASESORA por su incalculable apoyo y tiempo en la realización de este trabajo.*

## ÍNDICE

RESUMEN.....	Pág. 01
ABSTRACT.....	Pág. 02
I. INTRODUCCIÓN.....	Pág. 03
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	Pág. 10
III. RESULTADOS.....	Pág. 22
IV. DISCUSIÓN.....	Pág. 29
V. CONCLUSIONES.....	Pág. 32
VI. RECOMENDACIONES.....	Pág. 33
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Pág. 34
VIII. ANEXOS.....	Pág. 39

**“Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon* (limón) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. 2015”.**

**RESUMEN**

**Objetivo.** Evaluar el 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.

**Métodos.** Se preparó el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limon* en cuatro concentraciones: 5%(50 mg/ml), 25%(250 mg/ml), 50%(500mg/ml) y 75%(750mg/ml). Para evaluar la actividad antimicrobiana de *C. limon*, se expuso a *S.aureus* meticilino resistente a las cuatro concentraciones del extracto etanólico, utilizando el método de Kirby – Bauer (difusión en disco), se comparó con el control vancomicina.

**Resultados.** Se determinó que *S. aureus* meticilino resistente, fue sensible a las cuatro concentraciones del extracto etanólico, al comparar los halos de inhibición según la escala de Duraffourd. Así mismo, el efecto inhibitorio promedio de la vancomicina sobre *S. aureus* meticilino resistente corresponde a la categoría sumamente sensible.

**Conclusión.** Cáscara de *Citrus limon* (limón) sí tiene efecto inhibitorio *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, pero es significativamente inferior al compararlo con vancomicina.

**Palabras clave:** *Citrus limon*, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, efecto inhibitorio, extracto etanólico.

**"*In vitro* inhibitory effect of ethanol extract of *Citrus limon* (lemon) peel on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. 2015 ".**

**ABSTRACT**

**Objective.** To evaluate the *in vitro* inhibitory effect of ethanol extract of *Citrus limon* (lemon) peel on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and compare the antimicrobial effect of vancomycin.

**Methods.** Ethanolic extract of *Citrus limon* peel was prepared at four concentrations: 5% (50 mg / ml), 25% (250 mg / ml), 50% (500 mg / ml) and 75% (750mg / ml). To evaluate the antimicrobial activity of *C. limon*, exposed to methicillin-resistant *S. aureus* at four concentrations of ethanol extract, using the method of Kirby - Bauer (disk diffusion), was compared with vancomycin control.

**Results.** It was determined that methicillin-resistant *S. aureus* was sensitive to the four concentrations of ethanol extract, comparing the inhibition halos as Duraffourd scale. Also, average inhibitory effect of vancomycin on methicillin-resistant *S. aureus* corresponds to the highly sensitive group.

**Conclusion.** *Citrus limon* (lemon) peel does have inhibitory effect *in vitro* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, but is significantly lower when compared with vancomycin.

**Keywords:** *Citrus limon*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, inhibitory effect, ethanol extract.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes:

*Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos humanos más importantes, se encuentra involucrado en diversidad de infecciones e intoxicaciones, pudiendo comprometer cualquier órgano del sistema. El tratamiento de dichas infecciones se ve dificultado por su elevada capacidad de generar resistencia antimicrobiana.<sup>1,2</sup>

La mayoría de infecciones son leves, en piel y tejidos, como la forunculosis, el impétigo y la foliculitis; pero puede producir cuadros graves que ponen en riesgo la vida de los pacientes, como la neumonía necrotizante, la osteomielitis, las bacteriemias, la endocarditis e infecciones por dispositivos asociados. La llegada de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SAMR), ha llegado a ser una preocupación mayor especialmente en el ambiente hospitalario, esto es por las hospitalizaciones prolongadas, mortalidad incrementada y costos elevados, comparados con infecciones debidas a *S. aureus* susceptible a meticilina.<sup>3,4</sup>

Estudios en el Perú, encuentran una elevada prevalencia de infección por SAMR, de aproximadamente 63,3 %, con rangos de 50-90%. Mientras que, en Bolivia el porcentaje de SAMR es de 16%, que coincide con los de Ecuador; sin embargo, son bajos comparados con los reportados por nuestro país que son los más altos en Latinoamérica, pero comparables con los encontrados en Europa (75%).<sup>5,6,7</sup>

El mecanismo molecular de resistencia a la meticilina consiste en la síntesis de una nueva proteína de unión a penicilina (PBP2a ) de 78 kDa con baja afinidad por la meticilina y el resto de betalactámicos; lo que impide que la meticilina pueda adherirse al lugar donde va a ejercer la acción de bloquear la enzima transpeptidasa (cuya función en el ciclo de vida bacteriana es sintetizar la pared bacteriana). El determinante genético de esta proteína es de naturaleza

cromosómica (gen mec A). El gen mec A está localizado en una isla genómica móvil conocida como Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec).<sup>8,9</sup>

Infortunadamente, las opciones terapéuticas para pacientes con infecciones SAMR son limitadas; lo que conduce a un mayor uso de glucopéptidos como la vancomicina, ya que todos los betalactámicos incluyendo las cefalosporinas y carbapenems, extendiéndose a otras familias antibióticas como las quinolonas y lincosamidas, son inefectivas contra SAMR. Lo que a su vez, origina un incremento notable de los costos de tratamiento de estas infecciones, pero más grave aún la presión selectiva antibiótica que conduce a la generación de resistencia a estas drogas, que se evidencia en la actualidad por la aparición de las cepas con resistencia intermedia y absoluta a Vancomicina, como lo muestran diversos reportes. Lo cual subraya la necesidad de nuevos antibióticos.<sup>6,10</sup>

El hombre desde la antigüedad ha usado sustancias naturales extraídas de las plantas para combatir enfermedades; teniendo la ventaja de que no representan un peligro para la vida y la salud del hombre, como sus homólogos los sintéticos.<sup>11</sup>

Según la organización mundial de salud (OMS), cualquier planta que contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o que son precursores de nuevas drogas semi-sintéticas se conoce como planta medicinal, siendo la mejor fuente para obtener medicamentos.<sup>12</sup>

*Citrus limon*, es el nombre científico del limón, perteneciente a la familia de las Rutáceas, que se originó en la zona tropical y subtropical sudeste asiático común. Limón es una planta medicinal importante, la cual se cultiva principalmente por sus alcaloides, que tienen actividad contra el cáncer y potencial efecto antibacteriano, en extractos crudos de ésta y cualquiera de sus partes (raíz, tallo, hojas, flor o fruto).<sup>13,14</sup>

Los cítricos en general contienen polisacáridos, lípidos, tocoferoles, carotenoides, terpenos, vitaminas, minerales, algunos ácidos orgánicos como ácido cítrico o ácido ascórbico y flavonoides (flavononas y flavonoles) que actúan como antioxidantes. El limón es una buena fuente de vitamina C, potasio y calcio.<sup>15,16</sup>

El limón, es uno de los cultivos más importantes de cítrico comercial, cultivada en todos los continentes del mundo. Dado que el zumo de cítricos es menos de la mitad del peso de la fruta, muy grandes cantidades de subproducto de desechos, como las cáscaras se forman cada año; las cáscaras mínimamente utilizadas en alimentación animal o fertilizantes, generalmente terminan en rellenos sanitarios y siendo un problema para las agencias de vigilancia de la contaminación. Gran parte del residuo sólido de cáscaras y semillas de cítricos son una fuente rica de aceites sin explotar, la cual no es tóxica y pueden ser utilizados por la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica.<sup>17,18</sup>

Las cáscaras de cítricos son ricos en nutrientes y contienen muchos fitoquímicos, estos pueden ser utilizados de manera eficiente como medicamentos. La cáscara del limón es una rica fuente de glicósidos flavonoides, cumarinas,  $\beta$  y  $\gamma$ - sitosterol, glucósidos y aceites volátiles. Además, la fibra de cítricos también contiene compuestos bioactivos, tales como polifenoles y flavonas polimetoxilatos, que contribuyen a su actividad antibacteriana y son raras en otras plantas.<sup>19</sup>

Los cítricos se cultivan en más de 140 países en todo el mundo, de los cuales, naranjas, toronjas y limones son los más altamente consumidos, llamando la atención de los investigadores por su multitud de compuestos bioactivos, incluyendo a sus cáscaras y semillas. Estudios in vitro demuestran actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, insecticida, antioxidante y antiproliferativa.<sup>20,21</sup>

El estudio indio de Srividhya y col (2013) evaluó la eficacia de extractos de cáscaras de limón, naranja, lima y toronja con disolventes como etanol, acetona, cloroformo y hexano, contra patógenos comunes del tracto gastrointestinal: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* y *E. coli*, revelando que dichos extractos tienen mejores efectos inhibidores que los compuestos sintéticos. Además, en el concentrado de extracto de etanol, el limón mostró un mejor efecto inhibitorio sobre la *E. coli* y *Shigella spp.* que con los otros cítricos con mismo diluyente.<sup>22</sup>

El estudio malayo de Sekar y col (2013) compara las propiedades antibacterianas del extracto de metanol de cinco variedades de cáscaras de cítricos, incluido el limón, por el método de difusión en disco. Los resultados indican que el extracto de metanol de variedades de cítricos, mostró moderada actividad antibacteriana hacia *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, habiendo mejor inhibición con las cáscaras de mandarina y naranja dulce.<sup>23</sup>

El estudio indio de Dhanavade y col (2011) evalúa el efecto antibacteriano del extracto de las cáscaras del limón con diferentes disolventes como etanol, metanol y acetona. Probando una mayor actividad antibacteriana con el disolvente de etanol contra *P. aeruginosa* y *S. aureus*, en comparación de otros disolventes como metanol y acetona.<sup>24</sup>

El estudio japonés de Miyake y col (2011) identifica y aísla cuatro sustancias antibacterianas de la cáscara del limón, que eran activos contra las bacterias orales que causan la caries dental y la periodontitis, como *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, y *Porphyromonas gingivalis*. Las sustancias antibacterianas que son extraídas son 8-geranyloxypsolaren, 5-geranyloxypsolaren, 5-geranyloxy-7-metoxicumarina y floroglucinol 1-β-D-glucopiranósido, que debido a sus propiedades hidrofóbicas se extrajeron eficazmente con etanol y n-hexano, pero no del agua. El etanol fue superior al n-hexano como disolvente de extracción para los compuestos anteriores.<sup>25</sup>

El estudio británico de Fisher y col (2006), investigó la eficacia de aceites esenciales y sus componentes volátiles de limón, bergamota y naranja contra una serie de patógenos transmitidos por alimentos comunes. Mostraron que los tres cítricos poseen actividad antibacteriana, siendo la bergamota la más efectiva. Además, encontraron que las bacterias Gram positivas eran más susceptibles que las Gram negativas in vitro. De las bacterias Gram positivas ensayadas *S. aureus* fue el menos susceptible a tantos los aceites como a los componentes probados.<sup>26</sup>

El estudio venezolano de Martínez y col (2003) evalúa la actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina, extraídos de su corteza, usando etanol como solvente sobre diversos patógenos. Obtuvo resultados comparables al estudio británico de Smith y col en 1998, donde las bacterias Gram positivas demostraron ser menos resistentes que las bacterias Gram negativas a los aceites esenciales de mandarina, limón y naranja. Concluyen que los aceites esenciales de mandarina tienen actividad antibacteriana del tipo bactericida contra las cepas bacterianas patógenas: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*.<sup>27,28</sup>

En el Perú, como en otros países en vías de desarrollo, las plantas medicinales representan aún la principal herramienta terapéutica en medicina tradicional. En los últimos años después de un período en que la industria farmacéutica se dedicó exclusivamente a la fabricación de fármacos de síntesis, hay un cambio a la búsqueda de nuevos medicamentos de origen herbario. Así tenemos, la investigación de Fernandez y col (2010) en el que evalúa efecto fungicida contra cepas de *Candida albicans* de los aceites esenciales de eucalipto, orégano, limón y mandarina. Demostrando efecto fungicida por parte de todos los aceites, incluido el limón.<sup>29,30</sup>

## 1.2. Identificación del Problema:

Las cáscaras de cítricos en general, tienen propiedades antioxidantes, germicidas, antitrombóticas, antidiabéticas, etc. Existen diversos estudios donde se ha demostrado la actividad antibacteriana de muchas plantas y frutos, incluidos los cítricos, tanto en nuestro continente como en los demás; sin embargo, son escasos los estudios donde la cáscara del limón sea la protagonista, a pesar de contener componentes importantes para ser un potencial agente antibacteriano. Dicho fruto se encuentra disponible durante todas las temporadas del año, siendo su zumo muy utilizado, ya sea en la industria alimentaria o cosmética y por tanto su cáscara como residuo en demasía, al que habría de tomar atención para traer productos útiles para la industria farmacéutica.<sup>31</sup>

Así, el estudio indio de Pandey y col (2011), se lleva a cabo para averiguar la actividad antimicrobiana del extracto de cáscaras y semillas de limón con diferentes disolventes como metanol al 80%, etanol al 70%, acetato de etilo al 100% y agua caliente, contra bacterias como *S. aureus*. El resultado del ensayo de susceptibilidad antimicrobiana, mostró prometedora evidencia de efecto antimicrobiano con la cáscara de limón, más que con la semilla; tanto con el diluyente de etanol o metanol.<sup>12</sup>

## 1.3. Justificación:

Debido a la necesidad de conocer las propiedades medicinales de las plantas, ya que se considera fuente saludable y existiendo poca información sobre los efectos antimicrobianos que presenta la cáscara del limón sobre los microorganismos como: *Staphylococcus aureus*, causante de enfermedades infecciosas, en diferentes órganos y sistemas del cuerpo; y ocasionando en estas últimas décadas, alarma en la población médica, por el avance en la resistencia a diferentes medicamentos, dejándonos con pocas posibilidades terapéuticas; se considera importante la realización de este estudio de investigación, con la finalidad de comprobar si existe

efecto inhibitorio de la cáscara de limón sobre *S. aureus* meticilino resistente. De probar la hipótesis, se comunicará el hecho a la comunidad científica, para que tengan en cuenta los beneficios del estudio y divulguen la información, a fin de encontrar nuevas alternativas terapéuticas contra dicho patógeno.

## 2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA CIENTÍFICO:

¿Existe efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon* (limón) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente?

## 3. HIPÓTESIS:

**H0:** “No existe efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon* (limón) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente”.

**H1:** “Existe efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon* (limón) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente”.

## 4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN:

### a. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon* (limón) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

## **b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Determinar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon* (limón) en concentraciones de 5%, 25%, 50% y 75%, utilizando el método de Kirby - Bauer (difusión en disco) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.
- Comparar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon* (limón) con el de vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

## **II. MATERIAL Y MÉTODO**

### **1. Poblaciones:**

#### **i. Población Muestral**

Estuvo constituida por cultivos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 25923.

#### **ii. Muestra**

#### **Unidad de análisis**

La unidad de análisis la constituyó cada una de las placas petris con cultivos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 25923, sometidas al extracto etanólico de cáscara de limón.

### **Unidad de muestreo**

La unidad de análisis, fue constituida por los halos de inhibición producto del efecto antibacteriano del extracto etanólico de cáscara de limón sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* metilino resistente ATCC 25923.

### **Tamaño de muestra**

Se determinó el tamaño muestral con la siguiente fórmula:

### **Tamaño muestral**

Se calculó el número de halos, considerando que los antibióticos de uso común presentan 80% de alta efectividad frente al 28% del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon*.

$$n = \frac{(Z\alpha_2 + Z\beta)^2 (p1.q1 + p2.q2)}{(p1 - p2)^2}$$

### **Donde:**

n = Número de elementos necesitados en cada uno de los dos grupos

p1= Proporción estimada con el atributo del grupo 1

p2 = Proporción estimada con el atributo del grupo 2

q1 = 1 - p1

q2 = 1 - p2

p2 - p1 = Mínimo nivel de diferencia que desea detectar entre los dos grupos (En estudio y contraste)

$Z_{\alpha/2}$  = Desviación normal para error alfa. Para 0,05 y dos colas  $Z_{\alpha/2}$ = 1.96

$Z_{\beta}$  = Desviación normal para error beta. Para 0,2 y una cola  $Z_{\beta}$ = 0.84

**Reemplazando valores:**

$p_1 = 0,80$
$p_2 = 0,28$
$q_1 = 0,20$
$q_2 = 0,72$
$Z_{\alpha/2} = 1,96$
$Z_{\beta} = 0,84$

$$n = \frac{(1,96 + 0,84)^2 ((0,80)(0,20) + (0,28)(0,72))}{(0,80 - 0,28)^2}$$

$n = 10$

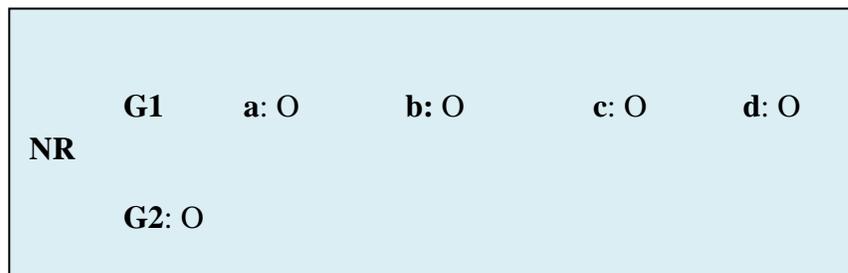
Con estos datos se determinó una muestra de 10 observaciones para cada concentración de extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon* para *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

## 2. DISEÑO DEL ESTUDIO:

### 2.1. Tipo de estudio:

El presente estudio corresponde a un diseño experimental, comparativo.

### 2.2. Diseño Específico:



Donde:

NR: Sensibilidad del *Staphylococcus aureus* meticilino resistente a las concentraciones del extracto etanólico de cáscara de limón y los antimicrobianos.

O: Medida de los halos

G1: Medida de sensibilidad del extracto etanólico de cáscara del limón sobre el *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

G1a: concentración 5%, G1b: concentración 25%, G1c: 50%, G1d:75%.

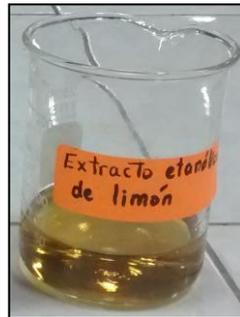
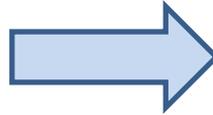
G2: Medida de sensibilidad de la Vancomicina sobre el *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

## 2.2.1 Diseño experimental:

### Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon*



Cáscaras de limón  
cortadas en trozos



G1a

5 gr de extracto seco  
100 mL de etanol



G1b

25 gr de extracto seco  
100 mL de etanol



G1c

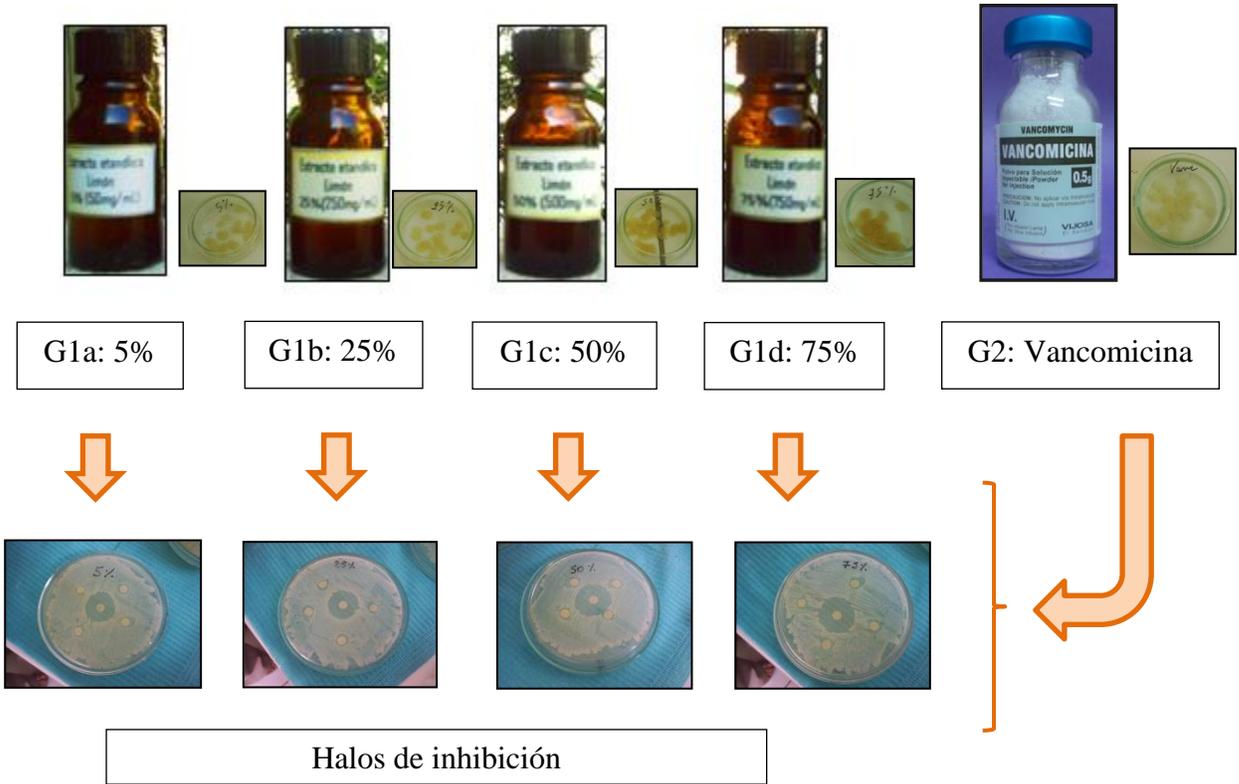
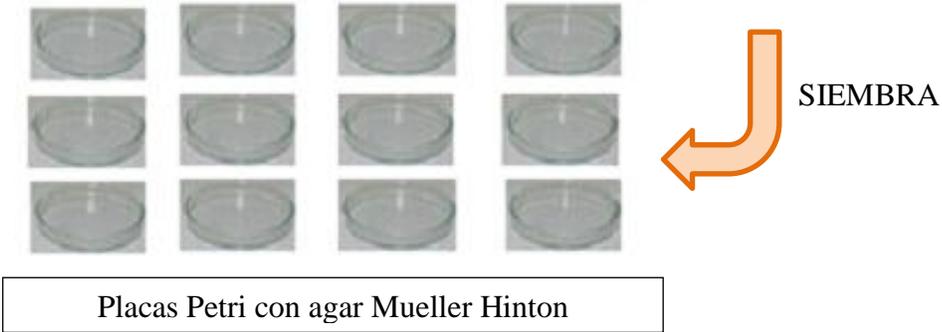
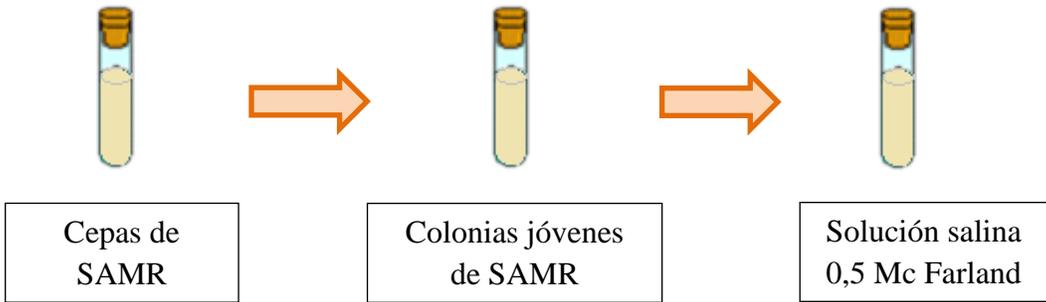
50 gr de extracto seco  
100 mL de etanol



G1d

75 gr de extracto seco  
100 mL de etanol

**Efecto inhibitorio del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, por Kirby - Bauer**



### 2.3. Descripción de variables y escalas de medición:

VARIABLE	UNIDAD DE MEDIDA	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDIDA
<b>Independiente</b> Extracto etanólico de cáscara de <i>Citrus limón</i>	Concentraciones al 5%, 25%, 50%, 75% del extracto etanólico.	Cualitativa	Ordinal
<b>Dependiente</b> Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente	Diámetro del halo de inhibición	Cuantitativa	De Razón

### 2.4. Definiciones Operacionales.

#### 2.4.1. Variable independiente:

**Extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon*:** Extracto con olor característico, obtenido a partir de la cáscara del fruto de *C. limón* (limón), por maceración en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico; contiene los principios activos de la cáscara.<sup>32</sup>

#### 2.4.2. Variable Dependiente:

➤ **Efecto inhibitorio *in vitro*:**

Capacidad para evitar la reproducción, crecimiento o producir la muerte de un microorganismo en condiciones experimentales, fuera de un organismo vivo.<sup>33</sup>

➤ **Halo de Inhibición:**

Zona alrededor del disco donde una sustancia antibacteriana es capaz de impedir el crecimiento de la bacteria al cabo de 18 a 24 horas de incubación. Se utilizará como medida los diámetros de estas zonas en mm, según la escala de Duraffourd.

➤ **Escala de Duraffourd:** Escala utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio *in vitro*, según diámetro de inhibición.<sup>34</sup>

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

### 3. Procedimientos:

3.1. **Obtención de las cáscaras de *Citrus limon*:** Se obtuvieron de una cevichería local, las cuales iban a ser destinadas a rellenos sanitarios. Las cáscaras fueron meticulosamente lavadas, además se les extrajo todo rastro de pulpa y jugo que pudo haber quedado.

3.2. **Extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon***

### ➤ **Método Maceración:**

En un recipiente de vidrio de boca ancha, se colocaron 400 g de cáscaras previamente lavadas y cortadas en trozos de 2 cm x 2 cm. Luego se añadió 1000 mL de etanol de 80° cubriendo las cáscaras y se mantuvo en reposo, en ausencia de luz y a temperatura ambiente por una semana, agitando esporádicamente el contenido. El macerado se filtró con papel filtro Whatman No. 5 y el filtrado se procedió a evaporar en un rotavapor (Heidolph WB 2000) a presión reducida y temperatura controlada, no mayor a 50°C. Finalmente, el extracto se colocó en cápsulas de porcelana y se llevó a secar a la estufa a 40 °C. De este extracto seco se prepararon las concentraciones de 5%, 25% 50% y 75% disueltas en etanol de 80°. Luego se realizó la separación por concentraciones en frascos de color ámbar, debidamente rotulados y esterilizados en autoclave por 15 minutos a 121 ° C y a 15 libras de presión. Dichas diluciones se mantuvieron en refrigeración a 4°C para su posterior utilización.<sup>35,36,37</sup>

(Ver Anexo N° 2: Fotografías 1,2,3,4,5)

### **3.3. Recolección de la muestra:**

#### **3.3.1. Cepa Bacteriana**

La cepa de *Staphylococcus aureus* metilino resistente ATCC 25923, fue obtenida del cepario de la Sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo. Una vez obtenida la cepa, se procedió a reactivarla utilizando caldo tioglicolato y luego fue conservada en agar soya tripticasa, hasta la realización del trabajo experimental.

### **3.4. Preparación del inóculo de *Staphylococcus aureus* metilino resistente.**

### Método de suspensión directa de colonias

Se utilizó el método de suspensión directa de colonias, por ser el más adecuado para la preparación del inóculo.

- (1) Se preparó el inóculo en caldo peptonado de las colonias aisladas seleccionadas de una placa de agar después de 24 horas de incubación (en un medio enriquecido, el agar soya tripticasa).
- (2) Se ajustó la turbidez de la suspensión hasta que sea equivalente al estándar 0,5 de la escala de McFarland. Se obtuvo así una suspensión que contiene aproximadamente de  $1 \text{ a } 2 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC)/ml para *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Para realizar éste paso con exactitud, se hizo una observación visual, con luz adecuada para comparar el tubo del inóculo con el estándar 0,5 de McFarland frente a una tarjeta de fondo blanco y líneas negras.<sup>38,39</sup> (Ver anexo N° 2: Fotografías 6,7)

### **3.5. Prueba de efectividad antibacteriana:** Mediante la técnica de Kirby- Bauer

#### Inoculación de las placas

- (1) Dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, se sumergió un hisopo de algodón estéril en la suspensión preparada. Se rotó el hisopo varias veces y presionó por las paredes internas del tubo por encima del nivel del líquido. Este procedimiento elimina el exceso de líquido del hisopo.
- (2) Se inoculó en la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton estriando con el hisopo toda la superficie del agar. Se repitió este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo. Como paso final, se estrió el hisopo por el borde del agar.

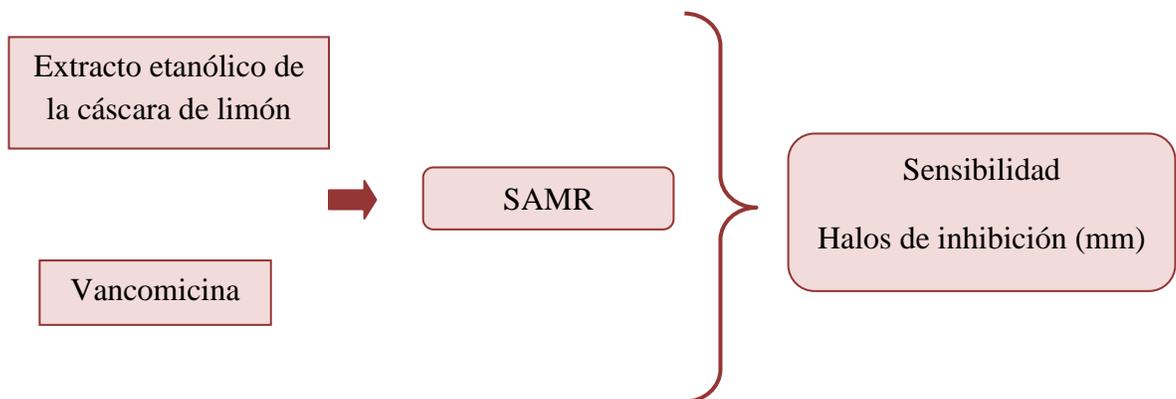
(3) La tapa se dejó entreabierta durante cinco minutos, para permitir que el exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar los discos impregnados con el antibiótico. Teniendo en cuenta el área de esterilidad.<sup>40</sup>  
41

### **Determinación del efecto inhibitorio (prueba de susceptibilidad)**

Mediante la difusión de discos de Kirby-Bauer, el cual consistió en preparar discos de papel de filtro estériles, de 6 mm de diámetro cada uno, los cuales se sumergieron dentro de cada concentración del extracto de cáscara de limón: 5%, 25%, 50% y 75% por el periodo de 1 hora y media, luego con una aguja estéril, éstos se colocaron sobre los cultivos de *S. aureus* meticilino resistente en las placas petri previamente preparadas; las placas se mantuvieron en la misma posición por un periodo de 5 minutos. De la misma manera, se preparó un control con vancomicina.

Luego de este tiempo las placas se voltearon de posición y se incubaron a 37° C, durante 24 horas. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm de la llama de un mechero.

Posteriormente, se llevó a cabo la lectura de los resultados, mediante la inspección visual de cada placa. Se efectuó tomando el registro en milímetro de los halos de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. (Ver anexo N° 2: Fotografías 8,9,10,11,12,13)



#### 4. Procesamiento y Análisis de la información:

El procesamiento de la información fue automático y se utilizó una computadora Pentium IV con Windows SEVEN y el Software estadístico IBM SPSS 22.

- **Estadística descriptiva:** Para analizar la información se construyeron tablas de distribución de frecuencias de una entrada con sus valores absolutos. Se calculó su media y su desviación estándar.
- **Estadística analítica:** Para determinar el efecto *in vitro* del extracto etanólico de la cáscara de limón sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, se utilizó un análisis de varianza de un diseño completamente aleatorizado para el efecto antibacteriano analizado por el halo de inhibición, luego se hizo una prueba de comparaciones múltiples: Prueba Duncan, ambas con un nivel de significancia del 5%.

Todos estos datos fueron procesados de manera automatizada con el soporte del software estadístico IBM SPSS versión 22.

#### 5. CONSIDERACIONES ÉTICAS:

El proyecto de investigación se presentó para consideración, comentario, consejo y aprobación a los comités designados por la Facultad de Medicina de la UPAO.

Al realizar la investigación se tuvo en cuenta principios de bioseguridad, prestando atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente. Declaración de Helsinki II.<sup>42</sup>

### III. RESULTADOS

El presente estudio experimental *in vitro* cuyo propósito fue determinar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de cáscara de *C. limon*, a diferentes concentraciones, sobre *S. aureus* meticilino resistente y posteriormente compararlo con el efecto de la Vancomicina.

Después de realizar la prueba de susceptibilidad y medir los halos de inhibición, se obtuvieron los siguientes resultados:

Para el grupo 1, *S.aureus* meticilino resistente es sensible a las diferentes concentraciones del extracto etanólico *C. limon* debido a que el promedio de los diámetros de los halos de inhibición son mayores a 8 mm según la escala de Duraffourd, como se observa en la tabla N°1, N°3 y gráfico N°1. Sin embargo, como apreciamos en la tabla N° 1, a la concentración de 5% y 25%, que corresponden a los subgrupos G1a y G1b, se encuentran algunos halos (2) de 7 mm de diámetro, lo cual nos haría dudar de que los diámetros superiores encontrados hayan sido producto del azar; sin embargo, esa suposición, la cual nos haría rechazar la hipótesis nula siendo cierta, tiene poca significancia estadística, ya que en la tabla N° 4 donde se realiza el Análisis de Varianza, tenemos un valor de P de 4.5573E-33 (0,000) la cual nos da una seguridad del 95% de que nuestra hipótesis alternativa es cierta. Por tanto, *S. aureus* meticilino resistente es sensible a las 4 concentraciones del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon*, correspondiendo todas ellas, a la categoría de sensible según Duraffourd.

Para el grupo 2, observamos que, en la tabla N°2 y N°3, el efecto inhibitorio promedio de la Vancomicina sobre *Satphylococcus aureus* meticilino resistente corresponde a la categoría sumamente sensible, según la escala de Duraffourd.

Posteriormente se realizó la prueba de Duncan, tabla N° 5, para comparar el efecto inhibitorio entre los subgrupos del grupo 1 (G1a, G1b, G1c, G1d) y a la vez con el grupo 2, donde se observa que existe diferencia estadística significativa entre los promedios de los

halos de inhibición hallados, en algunas de las concentraciones del extracto etanólico de *C. limon* utilizada ( $P < 0,05$ ); es decir, la certeza de que mientras mayor sea la concentración del extracto etanólico de *C. limon* mayor es el diámetro de halo de inhibición, es decir aumenta el efecto inhibitorio sobre *S.aureus* (efecto dosis dependiente). Sin embargo, como fue dicho, este efecto tiene diferencia estadística significativa sólo entre algunas de las concentraciones. Así, se observa que el extracto etanólico al 5% tiene diferencia estadística significativa con el extracto etanólico al 50% y al 75%, pero es semejante con el de 25%. A su vez, el extracto etanólico concentrado al 25% tiene diferencia estadística significativa con el extracto etanólico al 75%, pero no con el extracto al 5% o al 50%. Mientras que, el extracto etanólico al 50%, tiene diferencia estadísticamente significativa sólo con el extracto al 5%.

La Vancomicina (G2), por el contrario, tiene diferencia altamente significativa comparado con las cuatro concentraciones del extracto etanólico de cáscara de *C. limon* en la inhibición de SAMR. En la gráfica N° 1 podemos observar y corroborar este hecho, la línea de halos de inhibición de SAMR se eleva discretamente con las diferentes concentraciones del extracto etanólico de cáscara de limón y se despega con la vancomicina.

**Tabla N° 01:** Efecto inhibitorio promedio del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon* (limón) utilizando el método de Kirby - Bauer (difusión en disco) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

Halos de inhibición en mm del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de Concentración del extracto etanólico %		5 (G1a)	25 (G1b)	50 (G1c)	75 (G1d)
Número de repeticiones	1	9	8	10	11
	2	10	10	11	9
	3	8	9	9	11
	4	9	9	9	10
	5	7	10	10	8
	6	7	8	10	10
	7	8	9	8	10
	8	8	10	9	11
	9	9	7	9	11
	10	8	8	10	11
<b>Promedio</b>		<b>8,3</b>	<b>8,8</b>	<b>9,5</b>	<b>10,2</b>

**Fuente:** Datos obtenidos por el grupo investigador, año 2015.

El efecto inhibitorio promedio del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon* (limón) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente corresponde a la categoría sensible, según la escala de Duraffourd.

**Tabla N° 02:** Efecto inhibitorio promedio del antibiótico Vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

Aislamientos		Control Vancomicina (G2)
Número de repeticiones	1	23
	2	23
	3	21
	4	24
	5	23
	6	23
	7	26
	8	25
	9	23
	10	26
<b>Promedio</b>		<b>23.7</b>

**Fuente:** Datos obtenidos por el grupo investigador, año 2015.

El efecto inhibitorio promedio de la Vancomicina sobre *Satphylococcus aureus* meticilino resistente corresponde a la categoría sumamente sensible, según la escala de Duraffourd.

**TABLA N° 3:** Diámetro promedio del halo del efecto inhibitorio del antibiótico Vancomicina y diferentes concentraciones del extracto Etanólico de cáscara de *C. limon* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Grupos de Investigación	ni	Media	Desv. Est.
5%	10	8.3	0.95
25%	10	8.8	1.03
50%	10	9.5	0.85
75%	10	10.2	1.03
Vancomicina	10	23.7	1.57

**Fuente:** Datos obtenidos por el grupo investigador, año 2015.

**TABLA N° 4:** Análisis del varianza del efecto inhibitorio del extracto Etanólico de cáscara de *C. limon* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

FV	SC	gl	CM	F	P
Tratamiento	1702.6	4	425.65	342.652	0,000
Error	55.9	45	1.24		
Total	1758.5	49			

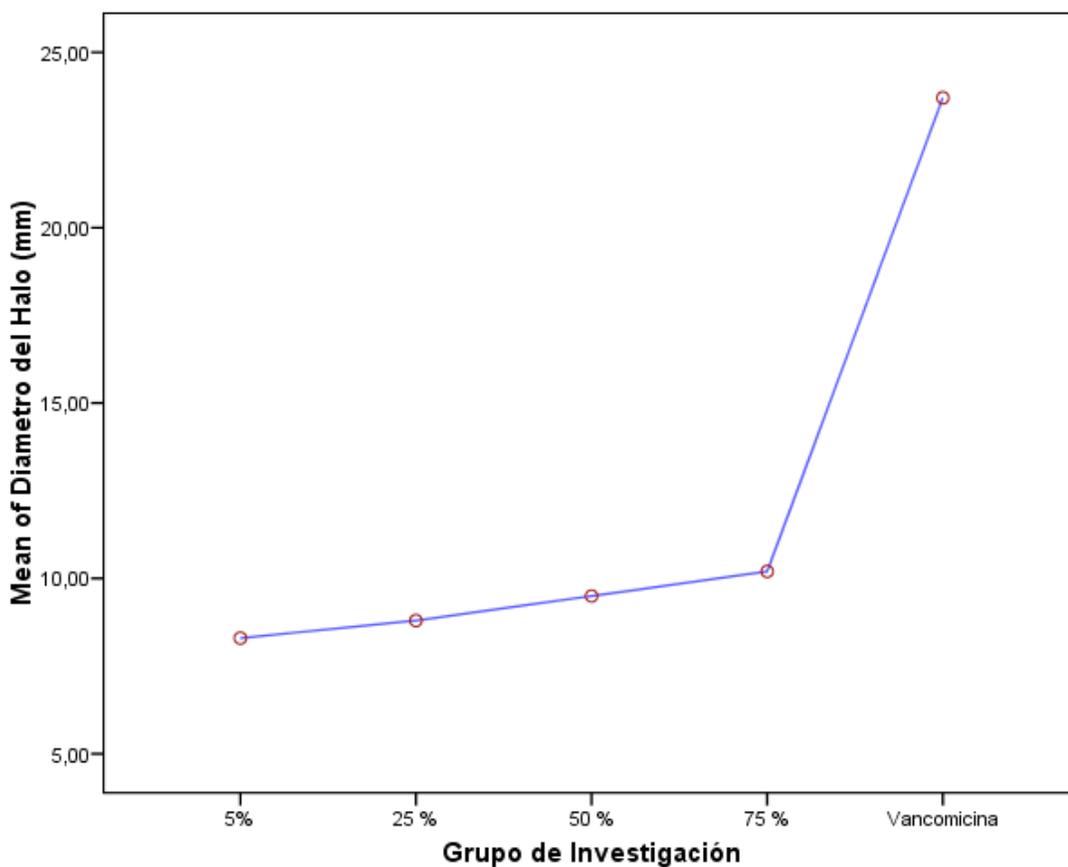
**Fuente:** Datos obtenidos por el grupo investigador, año 2015.

**TABLA N° 5:** Comparación múltiple del efecto inhibitorio del extracto Etanólico de cáscara de *C. limon* y antibiótico, mediante la prueba de Duncan sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Grupo de Investigación	ni	Grupo para alpha = 0.05			
		G1a	G1b	G1c	G1d
5%	10	8.3			
25%	10	8.8	8.8		
50%	10		9.5	9.5	
75%	10			10.2	
Vancomicina (G2)	10				23.7

**Fuente:** Datos obtenidos por el grupo investigador, año 2015.

**GRÁFICO N° 1:** Media del diámetro de los halos de inhibición en mm en función de cuatro concentraciones del extracto etanólico de *Citrus limon* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y control con Vancomicina.



**Fuente:** Datos obtenidos por el grupo investigador, año 2015.

#### IV. DISCUSIÓN

A lo largo de la historia de la humanidad, muchas enfermedades infecciosas han sido conocidas por ser tratadas con remedios herbales. Los productos de hierbas naturales, ya sea como compuestos puros o como extractos de plantas, siempre genera la oportunidad de nuevas drogas potenciales, la diferente estructura química y nuevos mecanismos de acción, esto cobra gran importancia debido al aumento en la incidencia de nuevas enfermedades infecciosas, así como el creciente desarrollo de resistencia a los antibióticos tradicionales. Los principios activos contenidos en las plantas pueden ser extraídos mediante diversas técnicas extractivas, siendo el etanol un solvente eficaz. Es así que, el efecto antibacteriano de los extractos puede variar desde la inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano hasta la acción bactericida.<sup>43,44</sup>

La presente investigación demostró la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la cáscara de *C. limon* frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente utilizando el método de Kirby - Bauer (difusión en disco). Se determinó que el grupo 1, extracto etanólico de la cáscara de *C. limon*, tuvo efecto inhibitorio *in vitro* frente a SAMR al comparar los halos de inhibición según la escala de Duraffourd, para las 4 concentraciones utilizadas (G1a, G1b, G1c, G1d), correspondiendo a la categoría sensible. Además, se observó que hubo una diferencia dosis dependiente, debida a que las comparaciones entre algunas de las

concentraciones mostraron tener diferencia estadística significativa, sin embargo al compararlo con la Vancomicina, grupo 2, ésta última mostró un efecto superior.

Los resultados obtenidos se contraponen con los resultados encontrados por Pandey y col (2011) que hallaron actividad antimicrobiana frente a *Staphyococcus aureus* en el extracto etanólico de cáscara de *C. limon* concentrado al 70%, con halos de inhibición promedio de 21 mm, mientras que en el presente trabajo el mayor promedio de halos es de 10,2 mm con el extracto etanólico al 75% (G1d). Esto, tal vez deba su causa, a diferencias en el método de la preparación del extracto, donde en el trabajo referencial, se molieron las cáscaras antes de ser maceradas, luego permaneciendo en reposo sólo durante 4 días. También puede deberse a la edad de los frutos de donde se obtuvieron sus cáscaras. Otra posibilidad, podría ser que el microorganismo con el que trabajaron, fue una cepa de *S. aureus* susceptible a meticilina.<sup>12</sup>

La actividad antimicrobiana de *C. limon*, se puede explicar por el gran contenido de compuestos fenólicos, sobre todo los flavonoides que posee la cáscara del fruto, que si bien es conocida por su poder antioxidante también es importante como antibacteriano. Los tres tipos de flavonoides presentes en los cítricos son: flavanonas glicosídicas, las flavonas polimetoxiladas y los flavonoles.<sup>45,46</sup>

La actividad antibacteriana de los flavonoides se realiza gracias a la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, para lo cual los autores sugieren que el anillo B de los

flavonoides pueden jugar un papel en la intercalación o enlace de hidrógeno con el apilamiento de las bases de los ácidos nucleicos, lo cual inhibiría la síntesis de ADN y ARN. Otro mecanismo sería dañando la membrana celular bacteriana, esto se explica mediante dos teorías: perturbando la bicapa lipídica mediante la penetración directa de estas y mediante la disrupción de la función de barrera; con lo que se ocasiona la salida de los componentes celulares, lo cual se produce sobre todo en organismos Gram positivos como *Staphylococcus aureus*. Los licocalcones, otro tipo de flavonoides, inhiben el metabolismo energético, mediante la fuerte inhibición de la NADH-citocromo c reductasa.<sup>47,48,49</sup>

Según los resultados obtenidos, *C. limon* abre nuevas posibilidades en el campo de la investigación clínica y farmacológica, quizás no siendo una alternativa, pero sí un complemento natural, eficiente y de bajo costo, para el tratamiento de las múltiples infecciones que se producen por *S.aureus* y aprovechando un material destinado al desecho, con respaldo científico.

## V. CONCLUSIONES

1. Extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon* (limón) sí tiene efecto inhibitorio *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.
2. El extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limon* (limón) tiene efecto inhibitorio *in vitro* utilizando el método de Kirby – Bauer sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en las cuatro concentraciones utilizadas.
3. Los halos de inhibición promedios producidos por el extracto etanólico de cáscara de *C. limon* en las 4 concentraciones, pertenecieron a la categoría de sensible según la escala de Duraffourd.
4. El efecto inhibitorio del extracto etanólico al 5%, 25%, 50% y 75% de cáscara de *Citrus limon* es significativamente inferior al efecto de Vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

## VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar otros solventes en los extractos de *C. limon* para comparar con el extracto etanólico y determinar la efectividad de los diversos solventes.
- Se recomienda probar el efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de *C. limon*.
- Se recomienda aislar los principios activos causantes de la actividad antimicrobiana de *Citrus limon*.
- Se recomienda realizar pruebas *in vivo* para valorar la efectividad y la toxicidad que pueden proporcionar los componentes activos de *Citrus limon*, así como la dosis terapéutica para la población humana.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFIAS:

1. Tamariz JH, Cruz J, Atencia A, Figueroa J, Horna G, Guerra H. Resistencia a clindamicina inducida por eritromicina en *Staphylococcus aureus* aislados de tres hospitales de Lima, Perú. *Acta Med Per* 2009; 26(1): 12-16.
2. Tamariz J, Agapito J, Horna G, Tapia E, Vicente W, Silva M, et al. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. *RevMedHered* 2010; 21: 4-10.
3. Carmona E, Sandoval S, García C. Frecuencia y susceptibilidad antibiótica del *Staphylococcus aureus* proveniente de hisopados nasales en una población urbano marginal de lima, Perú. *RevPeruMed* 2012; 29(2): 206-11.
4. Mamani E, Luján D, Pajuelo G. Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. *AnFacMed Lima* 2006; 67(2): 120-124.
5. Mendoza CA, Velásquez R, Mercado L, Ballon J, Maguiña C. Susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* sensible, con sensibilidad "BORDERLINE" y resistentes a la meticilina. *RevMedHered* 2003; 14(4): 181-185.
6. Echevarria J, Iglesias D. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *RevMedHered* 2003; 14(4): 195-203.
7. Adamczyk L, Trigoso C, Vasquez A, Duran L. Determinacion de la Homoresistencia y Heteroresistencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente aislado de muestras de pacientes internados en los hospitales Boliviano Holandes, Hospital Obrero, y Hospital de Clinicas. *Rev. Cuadernos* 2005; 50(2): 7-11.
8. Pinho MG, de Lencastre H, Tomasz A. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98(19): 10886-91.
9. Weese JS, Archambault M, Willey BM, Hearn P, Kreiswirth BN, Said-Salim B, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000-2002. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(3): 430-5.

10. Mensa J, Barberán J, Llinares P, Picazo JJ, Bouza E, Álvarez F, et al. Guía de tratamiento de la infección producida por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Rev Esp Quimioter* 2008; 21(4): 234-258.
11. Hersom, A.C y E.D. Hulland. 1974. *Conservas Alimenticias*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. pp. 61-62.
12. Pandey A, Kaushik A, Kumar S. Evaluation of antimicrobial activity and phytochemical analysis of Citrus limon. *JPBMS* 2011; 13(17): 1-7.
13. Kawaii S, Yasuhiko T, Eriko K, Kazunori O, Masamichi Y, K. Meisaku, et al. Quantitative study of flavonoids in leaves of Citrus plants *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48: 3865-3871.
14. Zarina Z, Tan S. Determination of flavonoids in Citrus grandis (Pomelo) peels and their inhibition activity on lipid peroxidation in fish tissue. *IFRJ* 2013; 20(1): 313-317
15. Moreno DM, Neuza J. Potencial antioxidante de extractos de sementes de limão (Citrus limon). *CiêncTecnolAliment* 2010; 30(2): 489-493.
16. Cartaya O, Reynaldo I, Nogueiras C. Caracterización química del complejo de bioflavonoides del limón (CBL). *Ensayos* 2002; 6(18): 11-14.
17. Arriola E, García T, Guatemala G, García J. Estudio Preliminar de las Propiedades de la Semilla de Limón Mexicano (*Citrus aurantifoliaswingle*) para su Posible Aprovechamiento. *Inftecnol* 2006; 17(6): 97-102.
18. Reda SY, Leal ES, Caldas EA, Barana AC, Schnitzel E, Borba PI. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limoniaosbeck*) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. *CiêncTecnolAliment* 2005; 25(4): 672-676.
19. Tumane PM, Meshram VG, Wasnik D. Comparative study of antibacterial activity of peel extracts of Citrus aurantium l. (bitter orange) and Citrus medica l. (lemon) against clinical isolates from wound infection. *Int J Pharm Bio Sci* 2014; 5(1): 382 – 387.

20. Kim SY, Shin KS. Antimicrobial Activity of Trifoliolate Orange (*Poncirus trifoliata*) Seed Extracts on Gram-Negative Food-borne Pathogens. *Prev Nutr Food Sci* 2012; 17: 228-233.
21. Roy A, Saraf S. Overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(2): 191-201.
22. Srividhya M, Ramanathan K, Krishnanand N. Efficacy of citrus fruit peel extracts against pathogens causing gastrointestinal disorders. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013; 5(4): 160-163.
23. Sekar M, Afendi S, Bandira P, Hashim Z, Izzaty E, Krishnaswamy N, et al. Comparative evaluation of antimicrobial properties of citrus varieties available in malaysia market. *Int J Curr Pharm Res* 2013; 5 (4): 32-35.
24. Dhanavade M, Jalkute C, Ghosh J, Sonawane K. Study Antimicrobial Activity of Lemon (*Citrus lemon L.*) Peel Extract. *Br J PharmacolToxicol* 2011; 2(3): 119-122.
25. Miyake Y, Hiramitsu M. Isolation and extraction of antimicrobial substances against oral bacteria from lemon peel. *J Food Sci Technol* 2011; 48(5):635–639.
26. Fisher k, Phillips CA. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *J ApplMicrobiol.* 2006; 101(6): 1232-40.
27. Martínez J, Sulbarán B, Ojeda G, Ferrer A, Nava R. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *RevFacAgron* 2003; 20(4): 502-512.
28. Smith A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *LettApplMicrobiol* 1998; 26(2): 118-122.
29. Ruiz JR, Roque M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriente peruano. *Ciencia e Investigación* 2009; 12(1): 41-47.
30. Fernández G, Maurtua D, Aguilar D, Aída L, Delgado C, Díaz X, et al. Evaluación de la actividad antifúngica de aceites esenciales de eucalipto, orégano, limón y mandarina frente a *Cándida albicans* [Desarrollo de Proyectos de Investigación a través de Grupos de Trabajo con Estudiantes del Primer Año de la Facultad de

- Estomatología Roberto Beltrán]. 2010. Universidad Privada Cayetano Heredia, Perú.
31. Moreno DM, Neuza J. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (Citrus limon) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. Quim. Nova 2009; 32(4): 946-949.
  32. Castillo CN, Mejía E. Efecto inhibitorio in vitro de Myrciaria dubia “camu-camu” sobre Staphylococcus aureus y Candida albicans. [Tesis: para optar el grado de bachiller en medicina]. 2013. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
  33. Sacaquispe RE, Velasquez J. Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana. Lima: Instituto Nacional de Salud. Serie de Normas Técnicas N°30, 2002.
  34. Duraffourd C, D’hervocourt L, Lapraz JC. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1ª edición. Barcelona, España: Edit.Masson S.A. 1986.
  35. Miranda M. Métodos de Análisis de Drogas y Extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad Habana de Cuba.2002.
  36. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. 1ª ed. Universidad de la Habana. Cuba. 2 000.
  37. Ojito K. Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de Citrus spp. (Rutaceae). Rev. Cubana Plant Med. 2012; 17(4): 368-379.
  38. Sonnenwith L, Jareltt. Métodos y Diagnóstico de Laboratorio Clínico. Tomo II. 8va ed. Buenos Aires: Panamericana; 1983.
  39. Brooks G, Batel J, Morse S. Microbiología Médica de Jawest, Meldick y Adelberg. 16va ed. Mexico: El Manual Moderno; 1999.
  40. Koneman W, Allen S, Dowel V, Jarda W, Sonden H, WinnW. Diagnóstico Microbiológico. 3ra ed. Argentina: Panamerica; 1988.
  41. Cantón R, García JE, Gómez L, Martínez L, Rodríguez C, Vila, J, et al. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editor Picazo J J. España: 2000.
  42. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Adoptada por la 18 Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio de 1964 y enmendada por la

- 29 Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre de 1975, la 35 Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre de 1983 y la 41 Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre de 2011.
43. Rojas F, Silva LC, Sansó F, Galbán PA. El debate sobre la Medicina Natural y Tradicional y sus implicaciones para la salud pública. *Rev Cubana Salud Pública* 2013; 39(1): 107-123.
44. Guerra AE, Cano TM, Cruz S. Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físico-químicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. [Tesis: para optar el título de ingeniero químico]. 2005. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
45. Saumendu DR, Ratnali B, Jashabir C, Rimlee G, Runa L, Selima AA. Pharmacognostic, phytochemical, physicochemical property and antimicrobial activity studies of lemon peel oil. *J Nat Prod Plant Resour* 2012; 2(3): 431-435.
46. Escobar M, Barragán BE, Hernández HY. Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México. [Tesis: para optar el título de maestra en ciencias en alimentos]. 2010. Instituto Politécnico Nacional, México.
47. Dzoyem JP, Hamamoto H, Ngameni B, Ngadjui BT, Sekimizu K. Antimicrobial action mechanism of flavonoids from *Dorstenia* species. *Drug Discov Today* 2013; 7(2): 66-72.
48. Vargas RD, Torrescano GR, Mendoza AM, Vallejo B, Acedo E, Sánchez JJ, et al. Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleo. *Rev Cienc Bio* 2014; 16(1): 32-37.
49. Tim TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Ag* 2005; 26: 343-56.

# **ANEXOS**

**ANEXO N°1: Diámetros de halos de inhibición en mm del extracto etanólico de cáscara de *C. limon* en cuatro concentraciones sobre *S.aureus*. Control 1: vancomicina, control 2: solución salina.**

<b>Halos de inhibición en mm del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de Concentración del extracto etanólico %</b>		<b>5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>Control vancomicina</b>
<b>Número de repeticiones</b>	<b>1</b>	9	8	10	11	23
	<b>2</b>	10	10	11	9	23
	<b>3</b>	8	9	9	11	21
	<b>4</b>	9	9	9	10	24
	<b>5</b>	7	10	10	8	23
	<b>6</b>	7	8	10	10	23
	<b>7</b>	8	9	8	10	26
	<b>8</b>	8	10	9	11	25
	<b>9</b>	9	7	9	11	23
	<b>10</b>	8	8	10	11	26
<b>Promedio</b>		<b>8,3</b>	<b>8,8</b>	<b>9,5</b>	<b>10,2</b>	<b>23,7</b>

**FUENTE:** datos obtenidos por el investigador, año 2015.

## ANEXO N° 2: IMÁGENES



**Fotografía 1.-** Selección de las cáscara de limón, cortadas en trozos de 2 cm x 2 cm



**Fotografía 2.-** En un recipiente de boca ancha se cubrirá con etanol de 80°, se dejará en reposo y en ausencia de luz.



**Fotografía 3.-** Filtrando el macerado con papel filtro whatman N°5.



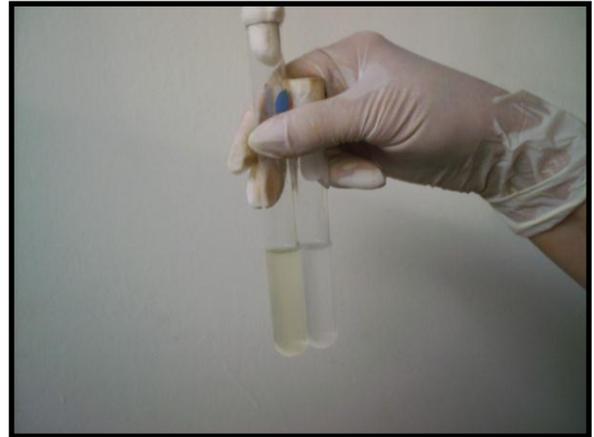
**Fotografía 4.-** Concentración del extracto etanólico en un equipo de rotavapor a una temperatura de 40 °C.



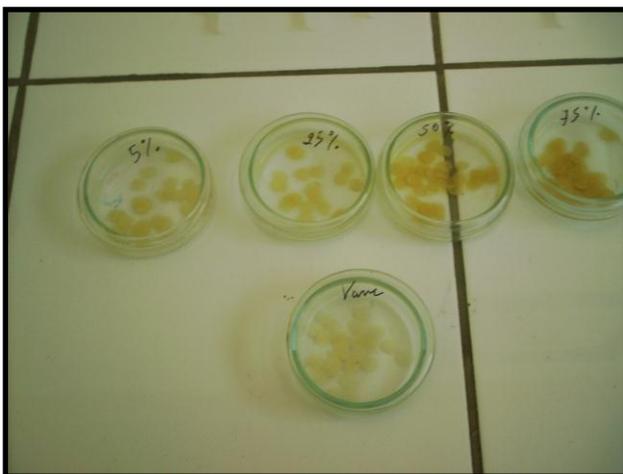
**Fotografía 5.-** (de izquierda a derecha) Macerado de limón, las 4 concentraciones de extracto etanólico: 5%, 25%, 50% y 75%, y extracto etanólico de limón sin concentrar.



**Fotografía 6.-** Preparación del inóculo bacteriano.



**Fotografía 7.-** Comparando que la turbidez sea semejante al tubo N° 0,5 de la escala de McFarland.



**Fotografía 8.-** Discos de papel filtro sumergidos dentro de cada concentración de extracto etanólico y en el control de vancomicina.



**Fotografía 9.-** Colocación de los discos de difusión en las placas previamente inoculadas.



**Fotografía 10.-** Halos de inhibición en la concentración de 5% de extracto etanólico de cáscara de *C. limon*. En el centro control de vancomicina.



**Fotografía 11.-** Leyendo los halos de inhibición en la concentración de 25% de extracto etanólico de cáscara de *C. limon*. En el centro control de vancomicina.



**Fotografía 12.-** Halos de inhibición en la concentración de 50% de extracto etanólico de cáscara de *C. limon*. En el centro control de vancomicina.



**Fotografía 13.-** Halos de inhibición en la concentración de 75% de extracto etanólico de cáscara de *C. limon*. En el centro control de vancomicina.