



UNID

UNIVERSIDAD INTERAMERICANA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA
CÁSCARA DE CITRUS LIMETTA RISSO (LIMA) FRENTE A STAPHYLOCOCCUS
AUREUS ATCC 25923.**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORES

LUQUE CUTIPA VILMA ROXANA

MENDIGUETE GARCÍA MARÍA CRISTINA

ASESOR:

MG. NESQUÉN JOSÉ TASAYCO YATACO

LIMA-PERU

2019

Dedicatoria

Al forjador de nuestro camino nuestro padre celestial, A nuestra familia por su apoyo a lo largo de la vida y a las personas especiales que nos acompañaron en esta etapa aportando en nuestra formación personal y profesional.

Los Autores.

Agradecimientos

Gracias por habernos acogido en sus aulas y a las autoridades de la Universidad interamericana para el desarrollo, quienes con sus aportes hacen posible el presente trabajo de investigación.

Los Autores.

Resumen

Citrus limetta Risso “Lima” es apreciado por sus propiedades alimenticias y medicinales, la cáscara contiene, en especial flavonoides con importantes propiedades antioxidantes. Objetivo. Comprobar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Método. Se empleó la técnica de difusión en agar Mueller-Hinton, las colonias de *Staphylococcus aureus* se prepararon por turbidez similar a la escala de MacFarland, los discos de sensibilidad se prepararon con papel Wattman N° 4, fueron embebidos con 100 uL de solución de cada tratamiento. Los tratamientos fueron; I) Etanol 96% (Control negativo), II) Ciprofloxacino inyectable 200 mg (Control positivo), III) Extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (EECCL) 100%, IV) EECCL 50%, V) EECCL 25%. Los discos se colocaron sobre la superficie del agar, luego se incubó a 37 °C durante 24 horas, seguido se midió el diámetro de los halos formados en cada grupo. Resultados. Se observó que el Ciprofloxacino presentó mayor diámetro en los halos (4,82 mm) y fue significativo respecto a las concentraciones del EECCL. La concentración de 100% del EECCL mostró mejor actividad antibacteriana respecto a las otras concentraciones del extracto, sin embargo, comparado con la concentración del 50% no fue significativo. En el EECCL se identificó taninos, flavonoides, cardenólidos, esteroides y/o triterpenoides. Conclusión. El extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) resultó tener actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* debido posiblemente a los metabolitos secundarios identificados en el EECCL.

Palabras clave: *Citrus limetta*, lima, antibacteriano, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

Citrus limetta Risso "Lima" is appreciated for its nutritional and medicinal properties, the shell contains, especially flavonoids with important antioxidant properties. Objective. Check the in vitro antibacterial activity of the ethanol extract of the *Citrus limetta* Risso shell (Lima) against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Method. The Mueller-Hinton agar diffusion technique was used, the *Staphylococcus aureus* colonies were prepared by turbidity similar to the MacFarland scale, the sensitivity discs were prepared with Wattman paper No. 4, they were embedded with 100 uL of solution of each treatment. The treatments were; I) Ethanol 96% (Negative Control), II) Injectable Ciprofloxacin 200 mg (Positive Control), III) Ethanol extract of *Citrus limetta* Risso shell (EECCL) 100%, IV) EECCL 50%, V) EECCL 25%. The discs were placed on the surface of the agar, then incubated at 37 ° C for 24 hours, followed by measuring the diameter of the halos formed in each group. Results It was observed that Ciprofloxacin had a larger diameter in the halos (4.82 mm) and was significant with respect to the concentrations of the EECCL. The concentration of 100% of the EECCL showed better antibacterial activity compared to the other concentrations of the extract, however compared to the concentration of 50% it was not significant. In the EECCL, tannins, flavonoids, cardenolides, steroids and / or triterpenoids were identified. Conclusion. The ethanolic extract of the *Citrus limetta* Risso peel (Lima) was found to have antibacterial activity in vitro against *Staphylococcus aureus* possibly due to the secondary metabolites identified in the EECCL.

Keywords: *Citrus limetta*, lima, antibacterial, *Staphylococcus aureus*.

Índice General

Dedicatoria	ii
Agradecimientos.....	iii
Resumen	iv
Abstract	v
Índice General	vi
Índice de tablas.....	viii
Índice de figuras	ix
Introducción	1
Capítulo I.....	2
Planteamiento del problema	2
1.1. Descripción de la realidad problemática.....	2
1.2. Formulación del problema.....	3
1.2.1. Problema general.....	3
1.2.2. Problemas específicos	3
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo general	3
1.3.2. Objetivos específicos.....	3
1.4. Justificación	4
Capítulo II	5
Fundamentos teóricos.....	5
2.1. Antecedentes Nacionales.....	5
2.3. Marco conceptual.....	11
2.4. Hipótesis	12
2.4.1. Hipótesis general	12
2.4.2. Hipótesis específica.....	12
2.5. Operacionalización de variables e indicadores.....	13
Capítulo III	14
Metodología	14
3.1. Tipo y nivel de investigación.....	14
3.2. Descripción del método y diseño.....	14

3.3. Población y muestra.....	16
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	17
3.5. Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	17
Capítulo IV	18
Presentación y análisis de resultados.....	18
4.1. Presentación de resultados.....	18
4.2. Prueba de Hipótesis.	20
4.3. Discusión de Resultados.....	22
Capítulo V	24
Conclusiones y recomendaciones.....	24
5.1. Conclusiones.....	24
5.2. Recomendaciones	24
referencias Bibliográficas.....	25
Anexos A: Matriz de consistencia.....	32
Anexo B: Instrumento.	33
Anexo C: Data consolidado de resultados.....	34
Anexo D: Cronograma del programa experimental.	35
Anexo F: Juicio de Expertos.	44

Índice de tablas

Tabla 1. Cuadro de identificación de principales metabolitos secundarios presentes en el Extracto de Citrus limetta Risso (Lima).....	13
Tabla 2. Marcha fitoquímica del extracto etanólico de la cáscara de Citrus limetta Risso (Lima).	18
Tabla 3. Cuadro de Prueba de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de Citrus limetta Risso (Lima) frente a Staphylococcus aureus ATCC 2592.	19
Tabla 4. Cuadro Análisis ANOVA del efecto antibacteriano del extracto etanólico de a cascara de Citrus limetta Risso .(Lima)	20
Tabla 5. Prueba de Duncan de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de Citrus limetta Risso (Lima) frente a Staphylococcus aureus ATCC 25923	20
Tabla 6. Prueba de Diferencia Mínima Significante (DMS) de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de Citrus limetta Risso (Lima) frente a Staphylococcus aureus ATCC 25923.	21
Tabla 7. Cuadro de la Prueba de Tukey de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de Citrus limetta Risso (Lima) frente a Staphylococcus aureus ATCC 25923.	22

Índice de figuras

Figura 1.	Planta de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima). Árbol o arbusto, armado con espinas gruesas. Hojas de 5 a 7.5 cm, elíptico-ovales, crenadas, el pecíolo estrechamente alado. Flores blancas. Fruto amarillo pálido, liso, de 5 a 7 cm de diámetro, zumo insípido.....	8
Figura 2.	Marcha fitoquímica del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima). En la marcha fitoquímica se determinó la presencia de flavonoides, taninos, terpenos, esteroides y triterpenos, en el extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima).....	15
Figura 3.	Efecto antibacteriano del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima) EECCL=Extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima).....	19
Figura 3.	Planta de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima). Recolección y clasificación del fruto de <i>Citrus limetta</i> Risso (lima).....	36
Figura 5.	Cáscara seca de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima) secado de la cascara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima).	36
Figura 6.	Preparación del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima)..	37
Figura 7.	Hisopos estériles y discos para el ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima)	37
Figura 8.	Materiales usados para el ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima).....	38
Figura 9.	Preparación del Ciprofloxacino para el ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima).....	39
Figura 10.	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y cultivo para el ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima)	39
Figura 11.	Sembrado de las colonias de <i>S. aureus</i> y colocación de discos para el ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima).	40

Figura 12. Incubación de las muestras de <i>S. aureus</i> en placa Petri para el ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima).....	40
Figura 13. Placas Petri con muestras de <i>S. aureus</i> luego de la incubación para el ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima). Fuente: propia.	41
Figura 14. Formación de los halos de inhibición del ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima).	41
Figura 15. Certificados de las Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	42
Figura 16. Constancia de clasificación taxonómica de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima).	43

Introducción

La bacteria *Staphylococcus aureus* puede infectar a los humanos en diferentes órganos, tales como la piel, tracto digestivo, faringe, vías respiratorias entre otros, se estima que la prevalencia en personas sanas colonizadas varía de 12 a 30%, las colonias tienen pigmentación dorada y da positivo a la prueba de coagulasa y catalasa. Castañeda (2018). Es probable que los portadores nasales de *Staphylococcus aureus* sean responsables de las infecciones producidas en la comunidad y hospitales. Arteaga (2018). La Organización Mundial de la Salud alerta sobre la resistencia a antibióticos de diversas bacterias, entre los destacan son *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* los mismos que constituyen un grave problema de salud pública. OMS (2019).

Las plantas medicinales desde tiempos remotos han sido usadas por pobladores de diferentes culturas hasta nuestros días para prevenir o tratar enfermedades, con la ventaja de brindar escasos efectos secundarios comparados con los medicamentos convencionales, cuyo uso racional puede ser útil en la atención sanitaria y contribuye como buena herramienta terapéutica para los profesionales de la salud. Consejo General de Colegios oficiales de Farmacéutico. (2019). A nivel mundial se cuenta con 17 países con alta diversidad de plantas medicinales, 8 países se ubican en América Latina: Ecuador, Brasil, Colombia, Bolivia, Venezuela, Costa Rica, México y Perú, sólo el 10% del total de plantas que habitan en el mundo han sido estudiadas científicamente con orientación medicinal, y por lo menos 15 mil plantas corren riesgo de extinción. OPS (2019).

Contribuir con el mejor conocimiento de las plantas medicinales de nuestro país constituye aporte importante para la terapéutica de enfermedades prevalente en nuestro medio como son las infecciones bacterianas, en el presente estudio se abarca sobre el estudio del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) frente a *Staphylococcus aureus*. Luego de aplicación de la parte metodológica se demostró que hubo actividad antibacteriana el cual fue menor respecto al antibacteriano Ciprofloxacino, los metabolitos identificados en el extracto fueron taninos, flavonoides, cardenólidos, esteroides y/o triterpenoides los mismos que estarían contribuyendo en forma sinérgica sobre la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*.

Capítulo I

Planteamiento del problema

1.1. Descripción de la realidad problemática

Staphylococcus aureus es una bacteria de gran importancia médica, considerada desde hace muchos años como uno de los principales patógenos en humanos. Bustos (2006). Presenta una alta patogenicidad siendo responsable de una amplia gama de enfermedades, que van desde procesos triviales hasta infecciones graves que ocasionan la muerte. Mamani (2006). Coloniza la piel y mucosas en un 30 a 50 % en adultos y niños sanos; siendo el 20 % de forma permanente y hasta un 30 % de forma intermitente. Álvarez; Tuchscher (2019). Algunas cepas denominadas epidémicas, parecen tener la capacidad de distribuirse de manera exitosa dentro de los hospitales y causar infecciones serias en los pacientes. Velásquez (2005). Los factores involucrados en esta epidemicidad son poco claros, indicándose: hospitalización prolongada, procedimientos prequirúrgicos, presencia de catéteres o prótesis y la permanencia en lugares de alto riesgo (unidades de cuidados intensivos, sala de neonatos y unidades pre quirúrgicas), entre otras. Arias; Sabbagh (2019). Aunque el uso de productos naturales bioactivos como preparaciones de medicamentos a base de plantas se remonta a cientos, incluso miles, de años atrás, su aplicación como compuestos aislados y caracterizados para el descubrimiento y desarrollo de medicamentos modernos comenzó solo en el siglo XIX, siendo bien documentado su papel fundamental en el desarrollo de estos medicamentos, especialmente para los agentes antibacterianos y antitumorales. Veeresham (2012). *Citrus limetta* Risso (Lima) se utiliza en forma popular como astringente, antiséptica, antihelmíntica, repelente de mosquitos, digestivo y estimulante del apetito, para enfermedades estomacales, antiescorbútico, tónico, diurético, para dolor de cabeza, artritis, dolores de garganta, tos y resfriados. También alivia los trastornos relacionados con el estrés, como los trastornos digestivos de origen nervioso o el insomnio. El aceite esencial ha mostrado actividad antihelmíntica, antimicrobiana, anticolinesterásica, de eliminación de radicales libres, antiespasmódica, anticoagulante y anticancerosa. Cabi (2019). Presenta como composición química una amplia variedad de compuestos tales como glúcidos, proteínas, fibra, vitamina C, betacarotenos, ácidos orgánicos, aceites esenciales, minerales, flavonoides y cumarinas (Cotanical. 1999; Torrenegra. (2017). En este sentido evaluar la actividad antibacteriana de *Citrus limetta*

Risso (Lima) frente a *Staphylococcus aureus* es de gran aporte al conocimiento de la flora tradicional peruana.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

- ¿El extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta Risso* (Lima) tendrá actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuáles serán los principales tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta Risso* (Lima)
- ¿Qué concentración del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta Risso* (Lima) tendrá mayor actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?
- ¿La actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta Risso* (Lima) será significativa respecto al Ciprofloxacino?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Comprobar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta Risso* (Lima) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

1.3.2. Objetivos específicos

- Identificar los principales tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta Risso* (Lima).
- Determinar la concentración del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta Risso* (Lima) con mayor actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Determinar si la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta Risso* (Lima) es significativa respecto al Ciprofloxacino.

1.4. Justificación

Staphylococcus aureus es uno de los principales patógenos causantes de infecciones en pacientes hospitalizados. Su éxito como patógeno y por ende su capacidad para causar una amplia gama de infecciones es el resultado de sus extensos factores de virulencia. Cervantes (2014). Actualmente la investigación en plantas ha influido fuertemente en el desarrollo de la biología y ha contribuido a muchos avances científicos importantes. Se ha llegado a transferirse genes fácilmente entre especies de plantas, logrando de esta manera estudiarlas fácilmente. Bermúdez (2005). En el caso de los medicamentos estos se descubrieron por primera vez como productos vegetales antes de que se desarrollaran métodos para su síntesis. Montpart (2005). Es precisamente esa investigación en plantas que ha producido una amplia gama de fármacos útiles en combatir enfermedades infecciosas. Entre estos a los antibióticos que son la principal fuente de combate a las enfermedades. Actualmente se considera que más del 20 por ciento de todos los medicamentos recetados se derivan de las plantas. Lo que pone en relieve el rol protagónico que representan para la humanidad en su conjunto. Rodríguez (2017). Entre los beneficios de los medicamentos en base a plantas es que estos tienden a tener una acción amplia en los sistemas fisiológicos al mismo tiempo. Suelen ser complementarios o sinérgicos y están orientados en la misma dirección terapéutica general teniendo rara vez reacciones adversas (Lima S. 2012). Conocer los compuestos químicos y la actividad antibacteriana de *C. limetta* permitirá generar alternativas viables de tratamiento para el caso de diversas afecciones que aquejan a la población, de una manera accesible, con menos efectos indeseados y de un modo deferente para con el medio ambiente.

Capítulo II

Fundamentos teóricos

2.1. Antecedentes Nacionales.

Juárez (2010). Desarrolló el estudio “caracterizaron el aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (Naranja dulce)”. Determinaron su actividad antibacteriana y formularon formas farmacéuticas. Se obtuvo el aceite utilizando un sistema de hidrodestilación con arrastre de vapor de agua. Se usó el método de difusión en agar probándosele frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25933 y *Staphylococcus epidermidis*, resultando en actividad antibacteriana con las concentraciones de 100 y 50%, respectivamente; sin evidenciarse esta actividad frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Gel con base de carbomer, loción con base de etanol y alcohol isopropílico, así como un colutorio fueron formulados. Concluyeron que *Citrus sinensis* L. Presenta actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25933 y *Staphylococcus epidermidis* y que también permite la elaboración de formulaciones.

Vargas (2015). Desarrolló el estudio “actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* en relación a *Listeria monocytogenes*”. Por arrastre de vapor con agua a partir del flavedo de la naranja se obtuvo el aceite. El método de difusión en agar a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100% del aceite fue utilizado; gentamicina y sulfametoxazoltrimetoprima fueron los antibióticos control. La concentración a 100% presentó mayor actividad antibacteriana respecto a las otras concentraciones ($p < 0,05$), siendo a su vez esta actividad similar a gentamicina ($p > 0,05$) y mayor que sulfametoxazol trimetoprima ($p < 0,05$). Concluyó que *C. sinensis* si presenta actividad antibacteriana frente a *L. monocytogenes* siendo la concentración al 100% de similar actividad que la gentamicina.

Mantilla (2018). Desarrolló el estudio “actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus paradisi* (tangelo) vinculada a *Staphylococcus aureus*”. La destilación por arrastre de vapor permitió obtener el aceite en base a concentraciones de 25,50 y 75% de *C. paradisi* (tangelo); vancomicina a 500 mg fue usada como control positivo, Kirby-Bauer se usó en treinta placas Petri con medición de halos de inhibición. A 25% se observó mayor actividad inhibitoria (1,8 mm) en los cultivos de *S. aureus*, mientras que a 50 y 75% fue disminuyendo esta

actividad inhibitoria. Concluyó que el aceite esencial del fruto de *C. paradisi* (tangelo) presenta actividad antibacteriana a la concentración de 25% y que a las concentraciones de 50% y 75% hay disminución tal vez en relación a la volatilidad que presentan estos aceites, asumió que los flavonoides serían los compuestos responsables de dicha actividad, en tanto apuntó la dificultad en asociarla a un único compuesto ya que estos pueden actuar sinérgicamente.

2.1.2. Antecedentes Internacionales.

Aibinu (2007). En Nigeria Desarrolló el estudio “potencia de *Citrus limetta* (Lima) contra diferentes patógenos usando el jugo, la cáscara quemada y el aceite obtenido por destilación al vapor” La actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante la difusión en pocillo de agar. Se utilizaron los anaerobios facultativos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25213, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi*, *Streptococcus* sp. Hongos: *Aspergillus niger* y *Candida albicans*; y Anaerobios estrictos: *Bacteroides* sp., *Porphyromonas* sp. y *Clostridium* sp. Los anaerobios y los Gram positivos fueron susceptibles a todos los extractos con una concentración inhibitoria mínima (CIM) que osciló entre 32 mg/mL y 128 g/mL. El aceite mostró actividad solo frente a *niger*, mientras que *C. albicans* fue susceptible a todos los extractos con CIM desde 256 mg/mL hasta 512 mg/mL. Los Gram negativos tuvieron una CIM que varía de 64 mg/mL a 512 mg/mL. La tasa de destrucción del extracto de schnapps en *S. aureus* y *E. coli* fue de 1 y 3,5 horas respectivamente.

Pérez (2017). En Colombia Desarrolló el estudio “actividad antibacteriana de los aceites esenciales de cascara de naranja dulce (*Citrus sinensis*) y limón criollo (*Citrus limetta*) como control en el añublo bacterial de la panícula del arroz”. Enfermedad que en Colombia causa entre 80 a 90% de pérdidas de producción en este producto, siendo las bacterias *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladiolis* asociadas como las causantes. Hidrodestilación asistida por radiación de microondas fue utilizada en la extracción de los aceites esenciales. Hubo inhibición del 100 % a 4000 ppm, indicándose al aceite esencial de cáscara de naranja seca con la mejor actividad inhibitoria frente a *B. gladiolis*, en contraparte el aceite esencial de limón fresco fue el de mayor inhibición frente a *B. glumae*. Concluyeron que se presentan como una alternativa sanitaria a los bioproductos evaluados para contrarrestar el añublo y aminorar las pérdidas agrícolas.

Méndez (2017). En Colombia Desarrolló el estudio “actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales en distintas especies del género *Citrus* frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiellapneumoniae*, *Pseudomonasaeruginosa* y *Escherichiacoli*, con valoración de la CMI y la CMB”.El momento de máxima densidad óptica (DO620) se usó para referirlo como tiempo de incubación con posteriores pruebas de evaluación de sensibilidad con la exposición de las cepas a concentraciones a 1000 µg/mL del extracto en caldo. Como solubilizante se empleó dimetilsulfóxido (DMSO) al 1%. En ensayos posteriores se determinó la CIMpor intermedio de microdilución en caldo, así como la CMB. Hallaron valores de actividad de los aceites esenciales del género *Citrus*de CMI \geq 600 mg/mL para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Consideraron que las diferentes especies del género *Citrus* son promisorias para el control de los microorganismos probados.

2.2. Bases teóricas

Citrus limetta Risso (Lima)

Es el fruto del árbol conocido como limero, cítrico de aroma placentero; se consume principalmente fresco, en la elaboración casera de jugos y postres, además de ser usado como condimento en la culinaria regional. Últimamente se ha incrementado su uso industrial para la obtención de jugos y concentrados, aceite esencial, pulpas y dulces. Gob (2019) Mexico.

Taxonomía de *Citrus limetta* Risso (Lima)

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

SUB CLASE: Rosidae

ORDEN: Sapindales

FAMILIA: Rutaceae

GÉNERO: *Citrus*

ESPECIE: *Citrus limetta* Risso



Figura 1. Planta de *Citrus limetta* Risso (Lima). Árbol o arbusto, armado con espinas gruesas. Hojas de 5 a 7.5 cm, elíptico-ovales, crenadas, el pecíolo estrechamente alado. Flores blancas. Fruto amarillo pálido, liso, de 5 a 7 cm de diámetro, zumo insípido. Fuente: Ivia.Gva. 2000.

Características botánicas de *Citrus limetta* Risso (Lima)

Citrus limetta (Lima) es un árbol de hoja perenne con pocas espinas y una corona globosa, crece 6 – 12 metros de altura. Cultivada en algunas regiones del mundo, particularmente en el Mediterráneo, América Central, América del Sur y la India, por su fruto comestible. Tres climas son adecuados para su producción comercial: tropicales, subtropicales con lluvia invernal como en el Mediterráneo y semitropicales con precipitaciones de verano que se encuentran tanto en Florida y el sur de Brasil Ivia. (2000). La siembra de la semilla se acondiciona mejor en contenedores. El proceso germinativo acontece mayormente dentro de 2 a 3 semanas a 13°C. Evitar el humedecimiento de las plántulas, regarlas con cuidado y mantenerlas bien ventiladas. La semilla generalmente es poliembriónica (con dos o más plántulas genéticamente idénticas al progenitor) que en general no portan carga viral proveniente de la planta originaria Msdmanuals . (2015).

Usos medicinales de *Citrus limetta* Risso (Lima)

Contiene una amplia gama de ingredientes activos los cuales se encuentran bajo investigación. Es rico en vitamina C, flavonoides, ácidos y aceites volátiles. También contiene cumarinas como el bergapteno (5-methoxypsoraleno) que sensibiliza la piel a la luz solar (promueve la pigmentación en la piel). Aplicaciones más recientes la indican como fuente de antioxidantes y exfoliantes en cosméticos especializados Ivia. (2000).

Staphylococcus aureus

Produce infecciones de leves a mortales. Infecta la piel (causando abscesos). Se acondiciona al torrente sanguíneo (bacteriemia) por lo tanto infecta prácticamente cualquier parte del organismo, principalmente válvulas cardíacas (endocarditis) y huesos (osteomielitis). Propenso a acumularse en dispositivos implantados en el organismo tales como prótesis, marcapasos, válvulas y catéteres insertados en los vasos sanguíneos a través de la piel Otariño. (2018). De manera natural, es susceptible a los antibióticos más conocidos. Sin embargo, existen cepas resistentes a estos antibióticos. Los genes de resistencia expresados por estas cepas son principalmente adquiridos de fuentes externas. Lo cual podría ser natural o debido a acciones humanas (abuso y mal uso) conducente a mutación cromosómica y selección de antibióticos. Correspondiéndose a estos hechos, la diseminación del *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) es de suma importancia sanitaria y socioeconómica. Siendo estas cepas una de las principales preocupaciones a nivel mundial. Anualmente, aproximadamente 23000 personas mueren debido a infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos. Estimándose pérdidas de 100 billones de dólares debido a esta problemática Otariño (2018). Las principales fuentes de *S. aureus* en los hospitales son las lesiones sépticas y los sitios de transporte de pacientes y personal. El transporte a menudo precede a la infección. Las narinas anteriores son el sitio de transporte más consistente, seguidas por el área perineal. La contaminación de la piel y la diseminación aérea varían notablemente entre los portadores y son más pronunciadas en los portadores combinados nasales y perineales. El principal modo de transmisión es a través de las manos contaminadas transitoriamente del personal del hospital. La transmisión aérea parece importante en la adquisición del transporte nasal Hussein (2019). Aproximadamente una de cada tres (33%) personas portan la bacteria *S. aureus* en la nariz, generalmente sin ninguna enfermedad. Aproximadamente dos de cada 100 personas tienen MRSA. Aunque muchas personas portan

la bacteria MRSA en la nariz, la mayoría no desarrolla infecciones graves por MRSA Sakr. (2018). En lo que respecta a la prevención y control de la transmisión e infección por MRSA se han establecido estrategias durante décadas. Las cuales incluyen precauciones estándar, precauciones de contacto y aislamiento, activa vigilancia de los cultivos, limpieza ambiental, descolonización dirigida o universal y programas de administración de antimicrobianos. Lamentablemente recursos limitados y falta de investigaciones son un gran desafío en la prevención y el control de MRSA en América Latina. Troeman (2019).

Metabolitos secundarios

Un metabolito es definido como la sustancia que el cuerpo elabora o usa cuando descompone los alimentos, medicamentos, sustancias químicas o su propio tejido (p. ej. grasa o muscular). Este proceso, llamado metabolismo, produce energía y materiales necesarios para el crecimiento, reproducción y mantenimiento de la salud (Cáncer G. 2019). El metabolismo es la suma de todas las reacciones bioquímicas llevadas a cabo por un organismo. Los metabolitos son moléculas intermediarias o productos del metabolismo y generalmente están restringidos a un bajo peso molecular. El término "secundario" introducido por Kossel en 1891 implica que, si bien los metabolitos primarios están presentes en todas las células vivas capaces de dividirse, los metabolitos secundarios están presentes solo de manera incidental y no son de importancia capital para la vida del organismo (Thirumurugan D. 2019). Por lo tanto, los metabolitos secundarios o los productos naturales se pueden definir como un grupo heterogéneo de productos metabólicos naturales que no son esenciales para el crecimiento vegetativo de los organismos productores, pero que se consideran compuestos de diferenciación ya que confieren roles adaptativos, al funcionar como compuestos de defensa o señalización de moléculas en interacciones ecológicas, simbiosis, transporte de metales (Thirumurugan D. 2019). Los alcaloides están presentes en los tejidos vegetales como sales solubles en agua de ácidos orgánicos (ácidos tartárico, acético, oxálico, cítrico, málico y láctico), ésteres (atropina, escopolamina, cocaína, aconitina) o combinados con taninos (corteza de Cinchona) o azúcares (glicoalcaloides de las especies de *Solanum*) en lugar de como bases libres (Eguchi R. 2019). Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, granos, cortezas, raíces, tallos, flores, té y vino. Se consideran un componente indispensable en una variedad de aplicaciones nutracéuticas, farmacéuticas, medicinales y cosméticas. Esto debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas, junto con su capacidad para modular funciones clave de la enzimática

celular (Panche A. 2016). Los taninos se consideran polifenoles debido a la gran cantidad de anillos fenólicos en sus estructuras. Estos productos naturales se pueden encontrar en ciertos tejidos vegetales, como la corteza, las frutas y la madera, y se pueden eliminar de estas fuentes mediante extracción con agua. Son responsables de la astringencia, el color y parte del sabor del té (De Hoyos P. 2019). Los terpenos son compuestos orgánicos volátiles formados por la unión de hidrocarburos de 5 átomos de carbono, conocidos como isopreno. Los terpenos son metabolitos secundarios, que proporcionan a la planta sus características organolépticas (aroma y sabor) y que constituyen la mayor parte del aceite esencial producido por las plantas aromáticas (Guimaráes A. 2019). Los esteroides, entre los cuales tenemos a los glucósidos cardíacos y las alcanidas, se limita a unas pocas familias de plantas. Sin embargo, cada vez es más evidente que todas las plantas contienen esteroides de algún tipo y que son constituyentes celulares de vital importancia (Speranza A. 2010).

2.3. Marco conceptual

- **Antibacteriano.** Sustancia que elimina o inhibe agentes bacterianos sin incurrir en el daño del objeto, ambiente u organismo que los porta. Tanto como los antibióticos u otros agentes químicos son fármacos capaces de combatir estos agentes.
- **Volatilidad.** Termodinámicamente mide la tendencia de una sustancia a pasar a vapor, también definida como medida de la capacidad con la que una sustancia se evapora. En base a parámetros de temperatura las sustancias con mayor presión de vapor se evaporan con mayor facilidad que aquellas con menor presión de vapor.
- **Flavonoides.** Pigmentos vegetales con fuerte capacidad antioxidante, considerados preventores del envejecimiento celular y los procesos degenerativos. Entre ellos tenemos a los fenoles, índoles, alilsulfuros.
- **Aceites esenciales.** Se encuentran en diferentes tejidos vegetales. Antiguamente llamados “alma de las plantas”. Químicamente tienen numerosos compuestos de tipo natural. Hallados en las hojas, cascara, semillas, cortezas y flores de las plantas.
- **Miscibilidad.** Habilidad de dos o más sustancias líquidas para mezclarse entre sí y formar una o más fases, es el conjunto de dos o más sustancias puras. Cuando dos sustancias son insolubles, ellas forman fases separadas cuando son mezcladas.
- **Cepas.** Bacterias biológicamente iguales, de la misma especie. Genéticamente una variante o subtipo de una especie bacteriana.

- **Hidrodestilación.** Por esta metodología se extraen aceites esenciales en base a la inmersión en agua en ebullición del material probado, siendo este contacto directo con el agua su principal característica.
- **Bioproductos.** Llamase así a los resultantes de procesos biológicos, bioquímicos y físicos (p. ej. fermentación, esterificación, transesterificación, digestión, hidrólisis con incorporación de enzimas, microorganismos, bacterias, etc).
- **Dimetilsulfóxido (DMSO).** Líquido orgánico incoloro que contiene sulfóxido, usado como disolvente orgánico y como medicamento (para reducción del dolor y la inflamación). Debido a su propiedad de atravesar rápidamente la epidermis y las membranas celulares acarreador de drogas o venenos. Disolvente aprótico y altamente polar. Miscible tanto con agua como con disolventes orgánicos (alcoholes, cetonas etc.).
- **Patógenos.** Incluye virus, bacterias o quistes, capaces de causar enfermedad (tifus, cólera, disentería) en un receptor (p. ej. humanos). La severidad de la sintomatología que ocasiona se refiere como virulencia.

2.4. Hipótesis

2.4.1. Hipótesis general

- El extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) tiene actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.4.2. Hipótesis específica

- Los principales tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) son taninos, flavonoides, cardenólidos, esteroides y/o triterpenoides.
- La concentración del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) que tiene mayor actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es al 100%.
- La actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) es significativa respecto al Ciprofloxacino.

2.5. Operacionalización de variables e indicadores

Tabla 1.

Cuadro de identificación de principales metabolitos secundarios presentes en el *Extracto de Citrus limetta* Risso (Lima).

Variables	Definición operacional	Dimensión o aspecto	Indicadores
Independiente			
Extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta</i> Risso (Lima)	<i>Citrus limetta</i> Risso (Lima) es una planta cítrica con amplias propiedades medicinales, la cual presenta en su composición metabolitos que favorecen estos procesos terapéuticos.	Metabolitos secundarios	Aminoácidos, Taninos Terpenos Esteroides Cardenolidos Flavonoides Triterpenos etc.
Dependiente			
Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> .	Característica que presenta una sustancia para destruir, suprimir el crecimiento o la capacidad de reproducción de las bacterias.	Ensayo antibacteriano <i>in vitro</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> Concentración del extracto	% de actividad antibacteriana. 100% 50% 25%

Prueba para la identificación de principales metabolitos secundarios presentes en el extracto de *Citrus limetta* Risso (Lima). Fuente: Elaboración propia.

Capítulo III

Metodología

3.1. Tipo y nivel de investigación

Según la naturaleza de la investigación es una investigación básica. Según la intervención del investigador es una investigación de tipo experimental. Según la planificación de las mediciones es prospectivo. Según el número de mediciones de la variable de estudio es longitudinal.

3.2. Descripción del método y diseño

Recolección de la planta *Citrus limetta* Risso (Lima) (Método Cytec. 2001).

La recolección de la planta de *Citrus limetta* Risso(Lima) fue en el mes de mayo en el distrito de Ingenio, provincia de Nazca, departamento de Ica, ubicado a una altitud de 1200 msnm. Luego se trasladó al laboratorio de investigación de la Universidad Interamericana para el Desarrollo.

Preparación del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso. (Lima)

Se procedió a extraer la cascara del fruto de la Lima, luego se picó finamente y se secó en la estufa a 30 °C durante 3 días. Luego se trituró hasta polvo fino, enseguida de pesó 200 gramos, se colocó en frasco ámbar y se agregó 1 litro de alcohol a 96° se tapó herméticamente y se dejó en maceración durante 10 días a temperatura ambiente y agitación cada 12 horas. Luego se filtró con la ayuda de una probeta, embudo, papel filtro y una fuente de vidrio, el líquido filtrado se llevó a la estufa hasta evaporación total del etanol y obtención de un extracto seco, finalmente el extracto obtenido se pesó y colocó en frasco ámbar, se almacenó en refrigeración hasta su uso.

Marcha Fitoquímica. Método Lock (2016).

La marcha fitoquímica del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) se realizó según la siguiente figura.

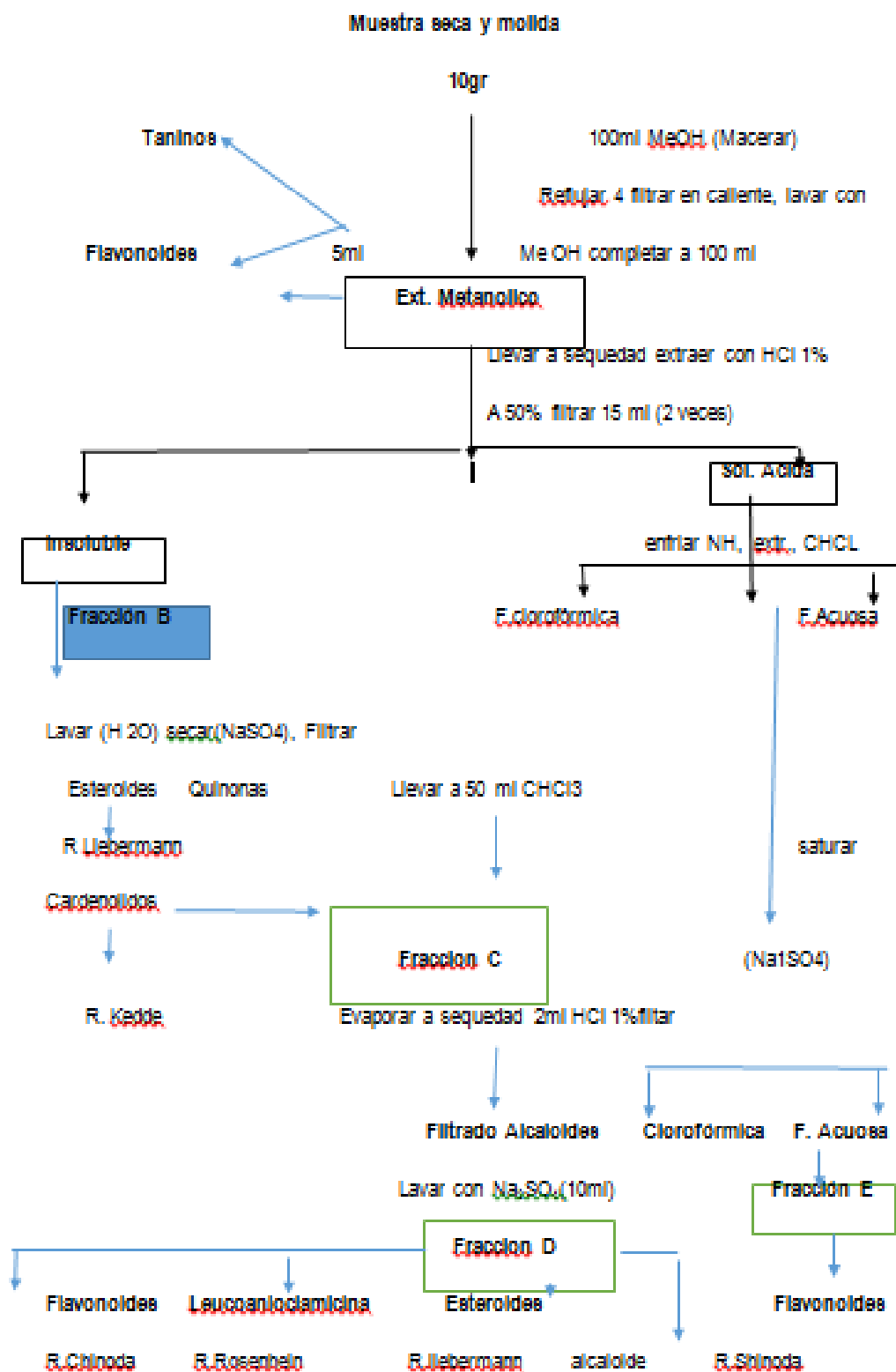


Figura 2. Marcha fitoquímica del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima). En la marcha fitoquímica se determinó la presencia de flavonoides, taninos, terpenos, esteroides y triterpenos, en el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima). Fuente: Ardoino. (2013).

Ensayo del efecto antibacteriano (Método Bernal M, 1984).

a. Preparación del inóculo bacteriano

Seleccionar 5 colonias de *S. aureus* ATCC 25923 en cultivo puro. Con un asa de siembra realizar un toque suave sobre la superficie de las colonias y traspasarlas a un tubo que contenga de 3-5 cm³ de caldo estéril de Mueller-Hinton.

b. Inoculación en placas Petri

Sumergir una torunda de algodón estéril, dentro de la suspensión de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (no usar cultivos sin diluir). Colocar el aplicador por encima del nivel del contenido del tubo y rotarlo contra sus paredes para retirar el exceso del inóculo, sembrarlo uniformemente sobre la superficie del medio con la torunda. Sembrar en tres direcciones. Evitar inóculos muy concentrados o muy diluidos. Dejar que la superficie del medio sembrado se seque durante 5-20 minutos, manteniendo la caja con la tapa cerrada.

c. Aplicación de los Discos de sensibilidad

Colocar los discos sobre la superficie del agar con un dispensador o con pinzas estériles, presionando los discos ligeramente sobre el agar. Incubar las cajas inmediatamente a 37°C.

d. Lectura

Medir la zona de inhibición de cada disco contra una superficie oscura bajo luz reflejada. Medir el diámetro de la zona incluyendo los 6 mm del disco sobre el respaldo de la caja de Petri sin remover la tapa.

3.3. Población y muestra

Población vegetal: Planta de *Citrus limetta* Risso. (Lima).

Población bacteriana: Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Muestra vegetal: Extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima).

Muestra bacteriana: 5 colonias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 los mismos que fueron sembrados en placas Petri.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se realizó un estudio observacional directo bajo parámetros de investigación controlados conducentes a la evaluación de la probable actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Citrus limetta* Risso (Lima) frente a *S. aureus* ATCC 25923. Los datos fueron registrados en fichas Ad hoc para los fines de la investigación, consignando los resultados tanto de laboratorios como los que correspondan al adecuado manejo del material biológico, ajustándose a lineamientos éticos para la correcta consecución del estudio.

3.5. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

El paquete estadístico SPSS versión 20 se usó para analizar los datos obtenidos, se realizó análisis de frecuencia, ANOVA, prueba de Tukey, Duncan y DMS (Diferencia Mínima Significante) para comparar los grupos de tratamiento, la significancia fue de 95% ($p < 0.05$).

Capítulo IV

Presentación y análisis de resultados

4.1. Presentación de resultados

Ensayo de solubilidad

Tabla 2.

Marcha fitoquímica del extracto etanólico de la cáscara de Citrus limetta Risso (Lima).

Fracción	Metabolito secundario	Reactivo	Resultado
A	Flavonoides	Shinoda	+++
	Grupo amino libre	Ninhidrina	+++
	Taninos	Cloruro férrico	+++
	Taninos	Gelatina	++
B	Triterpenos	Libermann Burchard	++
	Esteroides	Libermann Burchard	++
	Antraquinonas	Bortranger	-
C	Cardenólidos	Kedde	++
	Triterpenos	Libermann Burchard	++
	Esteroides	Libermann Burchard	+
	Alcaloides	Mayer	-
	Alcaloides	Wagner	-
	Alcaloides	Scott	-
D	Flavonoides	Shinoda	++
	Leucoantocianidinas	Rosenheim	-
	Cardenólidos	Kedde	++
	Triterpenos	Libermann Burchard	-
	Esteroides	Libermann Burchard	-
	Alcaloides	Mayer	-
E	Flavonoides	Shinoda	-
	Leucoantocianidinas	Rosenheim	-

Los principales metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) fueron Flavonoides, taninos, esteroides, triterpenoides, cardenólidos y grupo amino libre. Fuente: Elaboración propia.

Ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima).

Tabla 3.

Cuadro de Prueba de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 2592.

Grupos	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Actividad antibacteriana (%)
					Límite inferior	Límite superior			
Etanol 96% (control negativo)	5	1.38	0.59	0.27	0.64	2.12	1.0	2.4	0 %
Ciprofloxacino (control positivo)	5	4.82	0.41	0.19	4.31	5.33	4.3	5.3	100 %
EECCL 100%	5	2.88	0.69	0.31	2.02	3.74	1.8	3.6	60%
EECCL 50%	5	2.42	0.49	0.22	1.81	3.03	1.6	2.8	50 %
EECCL 25%	5	1.40	0.27	0.12	1.06	1.74	1.1	1.6	29 %

N=Número de repeticiones.

EECCL=Extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima).

Actividad antibacteriana (%) = Grupo tratado * 100 / Grupo control positivo.

En la prueba de actividad antibacteriana se evidenció que la concentración al 100% del EECCL tuvo 60% de inhibición de los halos respecto al ciprofloxacino, las concentraciones del 50% y 25 % mostraron inhibición de 50% y 29% respectivamente. La inhibición antibacteriana del EECCL fue dependiente de la dosis. Fuente: Elaboración Propia.

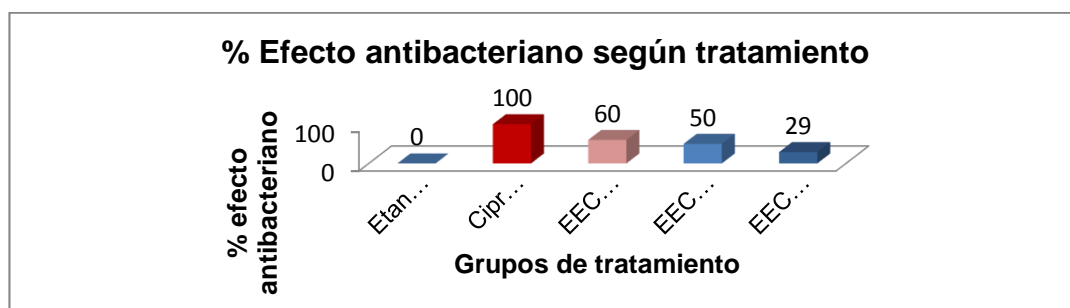


Figura 3. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima)

EECCL=Extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima). Fuente. Elaboración propia.

Tabla 4.

Cuadro Análisis ANOVA del efecto antibacteriano del extracto etanólico de a cascara de *Citrus limetta* Risso. (Lima)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	58.831	7	8.404	42.260	.000
Intra-grupos	6.364	32	.199		
Total	65.195	39			

El promedio de los halos formados en el ensayo del efecto antibacteriano se muestra que existe diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$), esto significa que existe efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* en por lo menos en uno de los grupos de prueba. Fuente: Elaboración propia.

4.2. Prueba de Hipótesis.

Hipótesis general

H1: El extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) tiene actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

H0: El extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) No tiene actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Tabla 5.

Prueba de Duncan de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Grupos	n	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	3	4
Etanol 96%	5	1.380		
EECCL 25%	5	1.400		
EECCL 50%	5		2.420	
EECCL 100%	5		2.880	
Ciprofloxacino	5			4.820
Sig.		.077	.113	1.000

En la prueba de Duncan se observa que las concentraciones 50% y 100% del EECCL tienen similar actividad antibacteriana ($p > 0.05$), esta actividad es mayor comparado con el grupo control etanol 96% y menor que el ciprofloxacino ($p < 0.05$). La concentración del 25% del EECCL presenta similar actividad respecto al grupo etanol 96% ($p > 0.05$). Por tanto, se rechaza H0 y se acepta la hipótesis H1.

EECCL=Extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima). Fuente: Elaboración propia.

Hipótesis específicas

H2: La concentración del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) que tiene mayor actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es al 100%.

H0: La concentración del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) que tiene mayor actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 No es al 100%.

Tabla 6.

Prueba de Diferencia Mínima Significante (DMS) de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de Citrus limetta Risso (Lima) frente a Staphylococcus aureus ATCC 25923.

(I) Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
EECCL 100%	Etanol 96%	1.5000	.2820	.000*	.925	2.075
	Ciprofloxacino	-1.9400	.2820	.000*	-2.515	-1.365
	EECCL 50%	.4600	.2820	.113**	-.115	1.035
	EECCL 25%	1.4800	.2820	.000*	.905	2.055

EECCL=Extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima).

* $p < 0.01$

** $p > 0.05$

La prueba de DMS (Diferencia Mínima Significante) muestra que la actividad antibacteriana de las concentraciones del 50% y 100% del EECCL son similares ($p > 0.05$). Al comparar los promedios de la concentración del 100% con el 25% del EECCL se muestra que los promedios antibacterianos son diferentes ($p < 0.05$). Por lo expuesto se rechaza la hipótesis H2 y se acepta H0. Fuente: Elaboración propia.

H3: La actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) es significativa respecto al Ciprofloxacino.

H0: La actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) No es significativa respecto al Ciprofloxacino.

Tabla 7.

Cuadro de la Prueba de Tukey de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

(I) Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Ciprofloxacino	Etanol 96%	3.4400	.2820	.000*	2.526	4.354
	EECC L 100%	1.9400	.2820	.000*	1.026	2.854
	EECC L 50%	2.4000	.2820	.000*	1.486	3.314
	EECC L 25%	3.4200	.2820	.000*	2.506	4.334

EECC L=Extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima).

*p<0.01

La prueba de Tukey muestra que el grupo del Ciprofloxacino tiene actividad antibacteriana mayor y significativa respecto a las tres concentraciones del EECC L (p<0.05), el cual indica que se acepta la hipótesis H3 y se rechaza la hipótesis H0. Fuente: Elaboración propia.

4.3. Discusión de Resultados.

El extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) evidenció presentar metabolitos secundarios (Tabla 1) que podrían presentar actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*. Chinini. (2018) demostraron que los flavonoides, compuestos fenólicos, saponinas, taninos y alcaloides presentes en el látex de *Croton lechleri* (sangre de grado) presentaron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* Chinini (2018). Ojeda (2018) demostraron que extractos de *Allium sativum* y *Zingiber officinale* ejercen actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, su actividad lo atribuyeron a los metabolitos secundarios presente en los extractos como compuestos fenólicos y alcaloides, la mejor actividad fue para el *A. sativum*.

Se observó que el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) en concentración del 100% mostró mejor actividad antibacteriana por presentar mayor tamaño de halos de inhibición respecto a las concentraciones de 50% y 25% (Tabla 2), la actividad antibacteriana fue menor respecto al Ciprofloxacino. Sin embargo la cáscara de *Citrus limetta* Risso posibilita el uso como alternativa de origen vegetal para el tratamiento frente a infecciones causados por *S. aureus*, que es una infección frecuente y que suele causar neumonías, endocarditis, artritis sépticas, infecciones cutáneas y muchas veces su

tratamiento es costoso con la terapéutica convencional Ojeda.(2018), por tanto el uso de la cáscara de la “Lima” sería más accesible y menor costo en especial para personas de bajos recursos económicos. Se ha reportado que el transporte nasal de *Staphylococcus aureus* representa un grave factor de riesgo para infecciones posteriores y que el tratamiento con antibióticos se ve obstaculizado por la aparición de resistencia bacteriana Schleimer. (2019). El aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos estimula buscar nuevas alternativas de tratamiento a base de extractos vegetales como el que se ha realizado en el presente trabajo de investigación. Ribotty. (2018) hallaron que el extracto acuoso de *Allium sativum* presentó actividad antibacteriana frente a *S. aureus* resistentes a meticilina y que el efecto dependió de la dosis. Estos hallazgos tendrían relación con lo demostrado en el presente estudio. Conclusión, el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) resultó tener actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* debido posiblemente a los metabolitos secundarios identificados el cual fue mayor conforme aumentó la concentración del extracto.

Capítulo V

Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

El extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) presentó actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*.

Los principales tipos de metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) fueron taninos, flavonoides, cardenólidos, esteroides y/o triterpenoides.

Las concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) que presentaron mayor actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* fueron 50% y 100%.

La actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) frente a *Staphylococcus aureus* fue significativamente menor comparado con el Ciprofloxacino.

5.2. Recomendaciones

Realizar investigaciones fitoquímicas que involucren purificación y elucidación estructural de los principales metabolitos secundarios presentes en la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima).

Realizar investigaciones para evaluar los probables efectos tóxicos a nivel preclínico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima).

Realizar investigaciones orientadas a demostrar su probable mecanismo de acción antibacteriano de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima).

Referencias Bibliográficas

- Aibinu, I., Adenipekun, T., Adelowotan, T., Ogunsanya, y Odugbemi, T. (2007). *Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of Citrus limetta* (Lime fruit) as used locally. *African Journal of Traditional CAM*. 4(2), 185–190.
- Álvarez, I. y Ponce, J. (2012). *Staphylococcus aureus, evolución de un viejo patógeno*. *Revista Cubana de Pediatría*. 84(2), 383-391.
- Arias, P., Calderón, L., Castillo, J., Moreno, J., Leal, y Cortés, J. (2016). *Factores de riesgo de la resistencia a meticilina de Staphylococcus aureus causante de bacteriemia: estudio multicéntrico de casos y controles emparejados*. *Biomédica*. 36(4), 612-619.
- Arteaga, L., López, y Chávez, M. (2018). *Prevalencia de Staphylococcus aureus que coloniza el personal de salud de un hospital de la ciudad de Cali*. *Rev. Cienc. Salud*. 14 (1): 9-19. DOI: 10.12804/revsalud14.01.2016.01.
- Bermúdez, A., Oliveira, y Velázquez, D. (2005). *La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales*. *Interciencia*. 30(8), 453-459.
- Bernal, M. y Guzmán, M. (2008). *El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer*. *Biomédica*. 4(3), 112-121.
- Botanical-online.com. (2019). *Barcelona, botanical-online. En línea. Fecha de acceso 27 mayo 2019. URL recuperado de <https://www.botanical-online.com/alimentos/lima-propiedades-caracteristicas>*.
- Bustos, J., Hamdan, y Gutiérrez, M. (2006). *Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad*. *Revista Biomedica*. 17(4), 287-305.
- Cabi.org. Oxon: (2019). CABI. En línea. Fecha de acceso 26 mayo 2019. URL disponible recuperado: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/13438>.

Cancer.gov. (2019). Bethesda: Instituto Nacional del Cáncer. En línea. Fecha de acceso 30 agosto 2019.

recuperado <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/metabolito>

Castañeda, P., Hernández, D., Muñoz, y Soto, L. (2018). *Frequency of S. aureus infections in hospitalized patients in a third level private hospital in Mexico City. Revista Médica MD. 9(4): 317-321.*

Cervantes, E., García, y Salazar, P. (2014). *Características generales del Staphylococcus aureus. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y de Medicina Laboratorial. 61(1), 28-40.*

Chininin, J. y Cisneros, C. (2018). *Evaluation of the in vitro antibacterial effect of Croton lechleri Latex "Grade Blood" versus Staphylococcus aureus ATCC 25923. Facultad de Medicina. Universidad San Pedro.*

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. (2019). *La Fitoterapia en manos de expertos. Infito. En línea. Fecha de acceso 04 octubre 2019. Recuperado de <https://www.portalfarma.com/Profesionales/medicamentos/Documents/2018-Consenso-plantas-medicinales.pdf>*

Cytec. (2001). *Métodos de evaluación de la actividad farmacológica de plantas medicinales. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo.*

De Hoyos, P., Merle, J., Labidi, y Charrier, F. (2019). *Tannins extraction: A key point for their valorization and cleaner production. Journal of Cleaner Production. 206, 1138-1155.*

Eguchi, R., Ono, N., Hirai, A., Katsuragi, T., Nakamura, S., Huang, y Kanaya, S. (2019). *Classification of alkaloids according to the starting substances of their biosynthetic pathways using graph convolutional neural networks. BMC bioinformatics. 20(1), 380.*

Gob.M. México D.F. Gobierno de México. (2019). En línea. Fecha de acceso 29 agosto 2019.

recuperado https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/96262/Lima_monografias.pdf

Guimarães, A., Meireles, L., Lemos, M., Guimarães, M., Endringer, D., Fronza, y Scherer, R. (2019). *Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. Molecules. 24(1): 2471.*

Hussein, N., Salih, R. y Rasheed, N. (2019). *Prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Hospitals and Community in Duhok, Kurdistan Region of Iraq. International Journal of Infection. 6(2), e89636.*

Ivia.gva.es. (2019). Valencia: *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. En línea. Fecha de acceso 29 agosto 2019.*

Recuperado <http://www.ivia.gva.es/documents/161862582/163533199/484-LIMETA+DE+MARRAKECH-IVIA-16.pdf/2127f65b-a34c-4865-a592-df1fd7dc01d7>

Juárez, J., Castro, A., Jaúregui, J., Lizano, J., Carhuapoma, y Choquesillo, F. et al. (2010). *Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de Citrus sinensis L. (Naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. Ciencia e Investigación. 13(1), 9-13.*

Lima, S., De Arrida, G., Renovato, y Alvarenga, M. (2012). *Representaciones y usos de las plantas medicinales en mayores. Revista Latino-americana de Enfermagem. 20(4), 1-9.*

Lock, O. (2016). *Investigación Fitoquímica. El departamento de ciencias – Pontificia. Universidad Católicas del Perú. Tercera Edición.*

- Mamani, E., Luján, y Pajuelo, G. (2006). *Perfil de sensibilidad y resistencia de Staphylococcus aureus. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. Anales de la Facultad de Medicina.* 67(2), 120-124.
- Mantilla, C. (2018). *Determinación del efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto Citrus paradisi ("Tangelo") frente a Staphylococcus aureus in vitro. Universidad Alas Peruanas.*
- Méndez, G., Torrenegra, y Pájaro, N. (2017). *Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género Citrus. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas.* 46(2), 160-175.
- Montpart, E, y Martín, M. (2005). *Medicamentos tradicionales a base de plantas. Offarm.* 24(6), 104-108.
- Msdmanuals.com. New Jersey: (2019). Manual MSD. En línea. Fecha de acceso 29 agosto 2019. URL disponible en:
Recuperado <https://www.msdmanuals.com/es-pe/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas/infecciones-por-staphylococcus-aureus>
- Ojeda, M. y Beltrán, R. (2018). *Efecto antimicrobiano in vitro de los extractos de Allium sativum y Zingiber officinale frente a Staphylococcus aureus. UCV – Scientia.* 10(2): 152-159. DOI: [dx.doi.org/10.18050/RevUcv-Scientia.v10n2a4](https://doi.org/10.18050/RevUcv-Scientia.v10n2a4)
- Organización Mundial de la Salud. (2019). *Resistencia a los antibióticos en todo el mundo. En línea. Fecha de acceso 04 octubre 2019. URL disponible en: recuperado* <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/>
- Organización Panamericana de la Salud. (2019). *Situación de Plantas Medicinales en el Perú. 2019. En línea. Fecha de acceso 04 octubre 2019.*

Recuperado

http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50479/OPSPER19001_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Otarigho, B. y Falade, M. (2018). *Analysis of antibiotics resistant genes in different strains of Staphylococcus aureus*. *Bioinformation*. 14(3), 113-122.

Panche, A., Diwan, y Chandra, S. (2016). *Flavonoids: an overview*. *Journal of nutritional science*. 5(1): 47-50.

Pérez, A., Vitola, D., Villarreal, J., Noya, B., Pérez, y Ramírez, S. et al. (2017). *Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de naranja dulce (Citrus sinensis) y limón criollo (Citrus limetta) como control en el añublo bacterial de la panícula del arroz*. *Limentech Ciencia & Tecnología Alimentaria*. 15(2), 28–44.

Ribotty, V. (2018). *Efecto in vitro del extracto acuoso de Allium sativum (ajo) sobre cepas de Staphylococcus aureus resistentes a la meticilina*. Tesis para optar el Título de Médico Cirujano. Universidad San Martín de Porres.

Rodríguez, C., Zarate, y Sánchez, L. (2017). *Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia*. *NOVA*. 15(27), 119-129.

Sabbagh, P., Riahi, S., Gamble, y Rostami, A. (2019). *The global and regional prevalence, burden, and risk factors for methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in HIV-infected people: A systematic review and meta-analysis*. *American Journal of Infection Control*. 47(3), 323-333.

Sakr, A., Brégeon, F., Mège, J., Rolain, y Blin, O. (2018). *Staphylococcus aureus Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections*. *Frontiers in Microbiology*. 9(1), 2419-2425.

Schleimer, N., Kaspar, y Knaack, D. et al. (2019). *In Vitro Activity of the Bacteriophage Endolysin HY-133 against Staphylococcus Aureus Small-Colony Variants and Their*

Corresponding Wild Types. Int. J. Mol. Sci. 20(1): 1-18. DOI: 10.3390/ijms20030716

Speranza, A. (2010). *Into the world of steroids: a biochemical "keep in touch" in plants and animals. Plant signaling & behavior.* 5(8), 940–943.

Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, y Vijayakumar, R. (2019). *An Introductory Chapter: Secondary Metabolites, Secondary Metabolites - Sources and Applications, Ramasamy Vijayakumar and Suresh S.S. Raja, IntechOpen.* DOI: 10.5772/intechopen.79766.

Torrenegra, M., Pájaro, y León, G. (2017). *Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género Citrus. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas.* 46(2), 160-175.

Troeman, D., Van, Hout, y Kluytmans, J. (2019). *Antimicrobial approaches in the prevention of Staphylococcus aureus infections: a review. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 74(2), 281–294.

Tropical.theferns.info. (2019). Useful Tropical Plants. En línea. Fecha de acceso 29 agosto 2019. URL disponible en:
recuperado <http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Citrus+limetta>

Tuscherr, L., Pöllath, C., Siegmund, A., Deinhardt, S., Hoerr, y Svensson, C. et al. (2019). *Clinical S. aureus isolates vary in their virulence to promote adaptation to the host. Toxins.* 11(135): 1-8

Vargas, D. (2015). *Efecto del aceite esencial de Citrus sinensis contra Listeria monocytogenes. Universidad Nacional de Trujillo.*

Veeresham, C. (2012). *Natural products derived from plants as a source of drugs. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology Research.* 3(4), 200–201.

Velásquez, M. (2005). *Surgimiento y diseminación de Staphylococcus aureusmeticilinorresistente. Salud Pública de México. 47(5), 381-387.*

Anexos A: Matriz de consistencia.

ROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>GENERAL 1. ¿El extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima) tendrá actividad antibacteriana in vitro frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923?</p> <p>ESPECÍFICOS 1. ¿Cuáles serán los principales tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima) 2. ¿Qué concentración del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima) tendrá mayor actividad antibacteriana in vitro frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923? 3. ¿La actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima) será significante respecto al Ciprofloxacino?</p>	<p>GENERAL 1. Comprobar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p> <p>ESPECÍFICOS 1. Identificar los principales tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima) 2. Determinar la concentración del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima) con mayor actividad antibacteriana in vitro frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 3. Determinar si la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima) es significante respecto al Ciprofloxacino</p>	<p>GENERAL 1. El extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima) tiene actividad antibacteriana in vitro frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p> <p>ESPECÍFICAS 1. Los principales tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima) son taninos, flavonoides, cardenólicos, esteroides y/o triterpenoides 2. La concentración del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima) que tiene mayor actividad antibacteriana in vitro frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 es al 100% 3. La actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima) es significante respecto al Ciprofloxacino</p>	<p>VI extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima)</p> <p>VD Actividad antibacteriano</p>	<p>Metabolitos secundarios</p> <p>Ensayo antibacteriano in vitro frente a <i>Staphylococcus aureus</i></p> <p>Concentración del extracto</p>	<p>Aminoácidos, Taninos Terpenos Esteroides Cardenólidos Flavonoides Triterpenos</p> <p>% de actividad antibacteriana</p> <p>100% 50% 25%</p>	<p>1) Etanol 96% 2) EECCL 25% 3) EECCL 50% 4) EECCL 100% 5) Ciprofloxacino</p>
	<p>Enfoque: Cuantitativo Tipo: Experimental Nivel: Explicativo</p>	<p>- Población vegetal: Planta de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima) - Población bacteriana: Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 - Muestra vegetal: Extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus limetta Risso</i> (Lima) - Muestra bacteriana: 5 colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 los mismos que fueron sembrados en placas Petri</p>	<p>Técnica: Observación Instrumento: Ficha de observación</p>	<p>Diseño de Investigación: Experimental, prospectivo, transversal</p>		

Anexo B: Instrumento.

Tratamientos	Grupos	Halos de inhibición (mm)
Etanol 96%	1	
	1	
	1	
	1	
	1	
Ciprofloxacino	2	
	2	
	2	
	2	
	2	
EECCL 100%	3	
	3	
	3	
	3	
	3	
EECCL 50%	4	
	4	
	4	
	4	
	4	
EECCL 25%	5	
	5	
	5	
	5	
	5	

EECCL=Extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limenta* Risso (Lima).

Anexo C: Data consolidado de resultados.

Tratamientos	Grupos	Halos de inhibición (mm)
Etanol 96%	1	1,0
	1	1,4
	1	1,0
	1	1,1
	1	2,4
Ciprofloxacino	2	4,9
	2	5,1
	2	5,3
	2	4,5
	2	4,3
EECCL 100%	3	2,7
	3	3,6
	3	3,3
	3	3,0
	3	1,8
EECCL 50%	4	2,5
	4	2,8
	4	2,8
	4	2,4
	4	1,6
EECCL 25%	5	1,6
	5	1,1
	5	1,6
	5	1,1
	5	1,6

EECCL=Extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limenta* Risso (Lima).

Anexo D: Cronograma del programa experimental.

ACTIVIDADES	MESES															
	1				2				3				4			
	SEMANAS															
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Recolección y clasificación del fruto																
Reconocimiento taxonómico Identificación botánica de <i>C. limetta</i> .																
Elaboración del extracto etanolico de <i>Citrus limetta</i> <i>R. issa</i> (LIMA).																
Marcha fitoquímica del extracto etanolico de <i>Citrus limetta</i> <i>R. issa</i> . (LIMA).																
Prueba de solubilidad del extracto etanolico de <i>Citrus limetta</i> <i>R. issa</i> (LIMA).																
Preparación de medios de cultivo																
Preparación de inóculo bacteriano																
Prueba de sensibilidad antimicrobiana ,cultivo y medición de halos de inhibición																
Elaboración de informes																

Anexo E: Testimonios Fotográficos.



Figura 4. Planta de *Citrus limetta* Risso (Lima). Recolección y clasificación del fruto de *Citrus limetta* Risso (lima). Fuente. Propia.



Figura 5. Cáscara seca de *Citrus limetta* Risso (Lima) secado de la cascara de *Citrus limetta* Risso (Lima). Fuente: propia.



Figura 6. Preparación del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima). Fuente: propia.



Figura 7. Hisopos estériles y discos para el ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima). Fuente: propia.

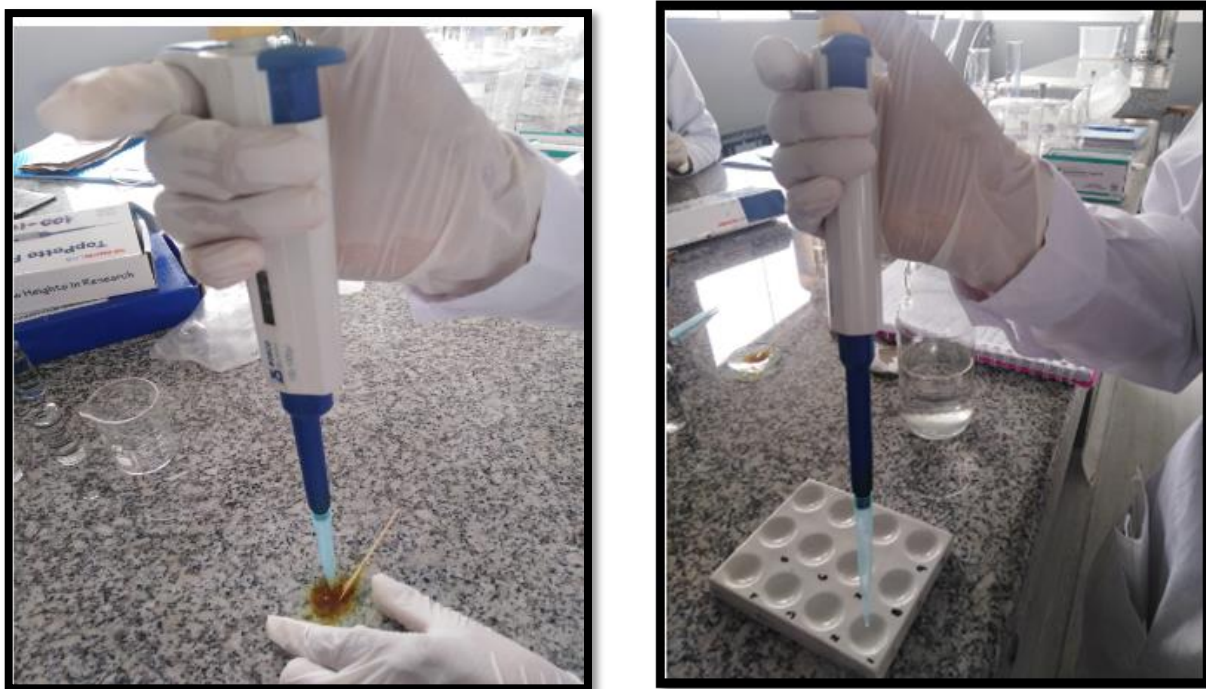


Figura 8. Materiales usados para el ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima). Fuente: propia.

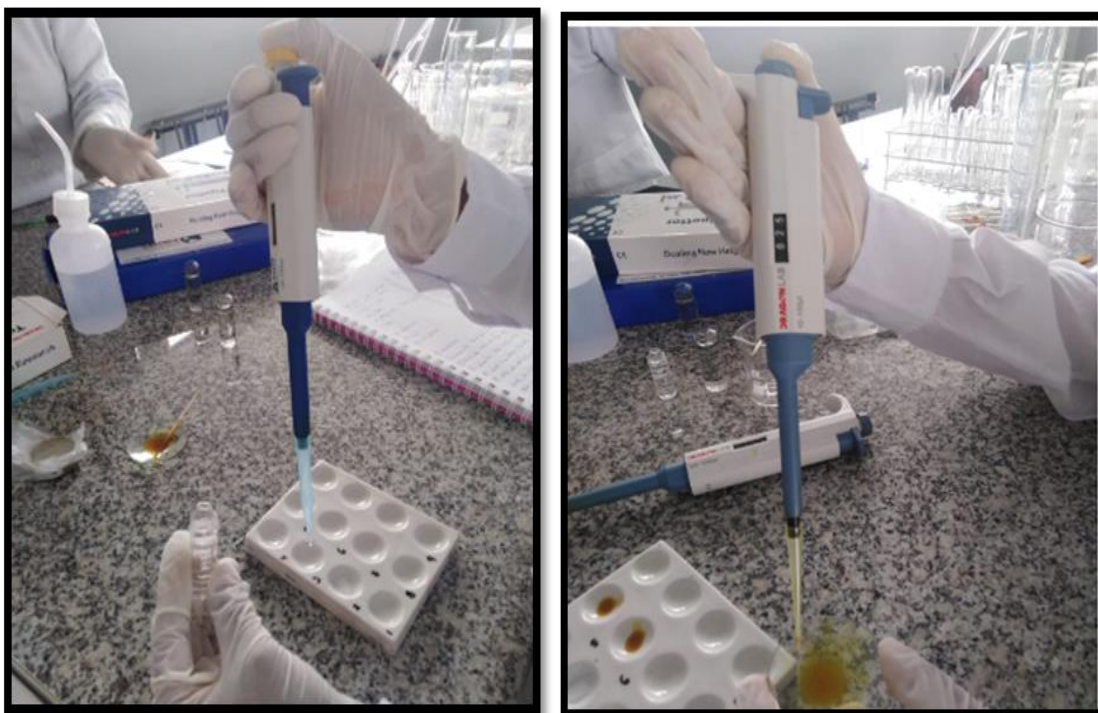


Figura 9. Preparación del Ciprofloxacino para el ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima). Fuente: propia.



Figura 10. Cepas de *Staphylococcus aureus* y cultivo para el ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima). Fuente: propia.



Figura 11. Sembrado de las colonias de *S. aureus* y colocación de discos para el ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima). Fuente: propia.



Figura 12. Incubación de las muestras de *S. aureus* en placa Petri para el ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima). Fuente: propia.



Figura 13. Placas Petri con muestras de *S. aureus* luego de la incubación para el ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima). Fuente: propia.

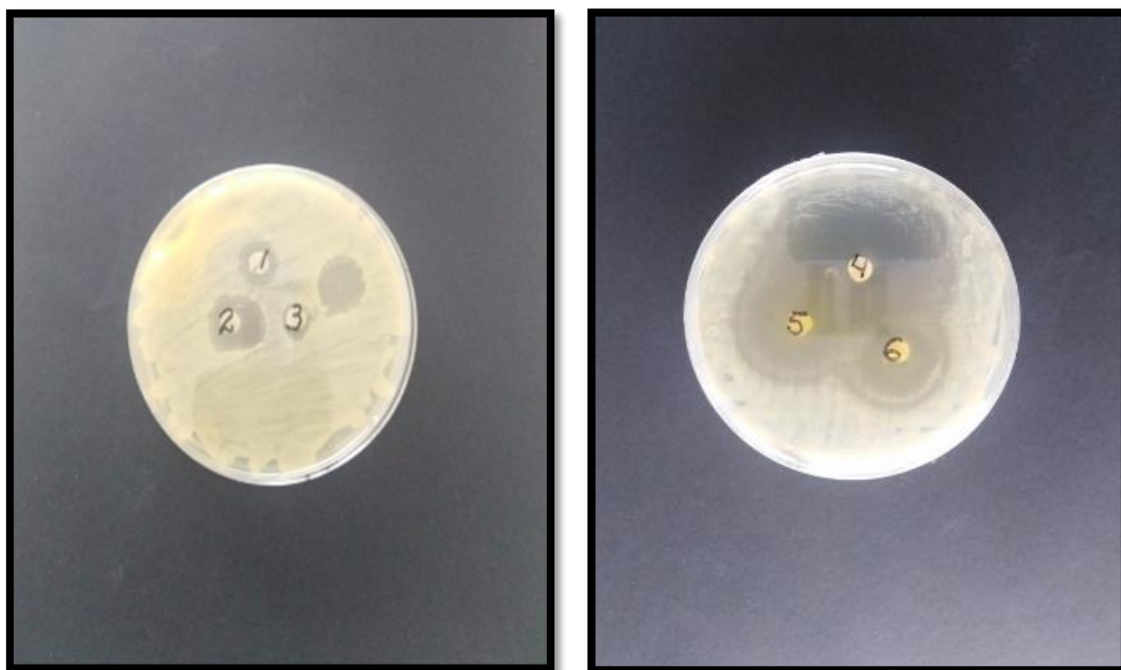
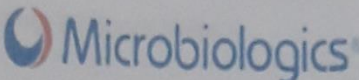


Figura 14. Formación de los halos de inhibición del ensayo de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima). Fuente: propia.

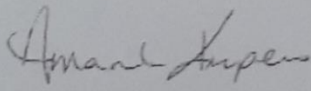


Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-334** Reference Number: ATCC® 25923™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2019/4/30 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2017/5/15
---	---

Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm
---	--


 Amanda Kuperus
 Quality Control Manager
 AUTHORIZED SIGNATURE

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


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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

ATCC Licensed
 Derivative

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


ACCREDITED

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

TESTING CERT #2655.01

Figura 15. Certificados de las Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



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

CONSTANCIA N° 183-USM-2019

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

La muestra vegetal (tallo hojas y frutos) recibida de **María Cristina Mendiquete García**, estudiante de la Universidad Interamericana para el Desarrollo, ha sido estudiada y clasificada como: ***Citrus limetta* Risso** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ROSIDAE

ORDEN: SAPINDALES

FAMILIA: RUTACEAE

GENERO: *Citrus*

ESPECIE: *Citrus limetta* Risso

Nombre vulgar: "lima"

Determinada por: Mag. María Isabel La Torre Acuy.

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

Lima, 06 de junio de 2019



ACE/ddb

Av. Armadas 1256, Jesús María
Apdo. 14-0454, Lima 14, Perú

Teléfono:
619-7000 línea 5701, 5702, 5704

E-mail: secretaria@usm.edu.pe
<http://www.usm.edu.pe>

Figura 16. Constancia de clasificación taxonómica de *Citrus limetta* Risso (Lima).

Anexo F: Juicio de Expertos.

FICHA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO POR JUICIO DE EXPERTOS.

I. DATOS GENERALES

- 1.1 Apellidos y nombres del experto: NESQUEN JOSÉ TASAYCO YATACO
 1.2 Grado académico: DOCTOR
 1.3 Cargo e institución donde labora: DOCENTE UNIVERSITARIO

Título de la Investigación: Actividad antibacteriana *In vitro* del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

- 1.4 Autor del instrumento: UNIVERSIDAD INTERAMERICANA PARA EL DESARROLLO
 1.5 Nombre del instrumento: JUICIO DE EXPERTOS UNID

INDICADORES	CRITERIOS CUALITATIVOS/CUANTITATIVOS	Deficiente 0-20%	Regular 21-40%	Bueno 41-60%	Muy Bueno 61-80%	Excelente 81-100%
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.				X	
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.				X	
3. ACTUALIDAD	Adecuado al alcance de ciencia y tecnología.				X	
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.					X
5. SUFICIENCIA	Comprende los aspectos de cantidad y calidad.					X
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del estudio.					X
7. CONSISTENCIA	Basados en aspectos Teóricos-Científicos y del tema de estudio.					X
8. COHERENCIA	Entre los índices, indicadores, dimensiones y variables.					X
9. METODOLOGIA	La estrategia responde al propósito del estudio.					X
10. CONVENIENCIA	Genera nuevas pautas en la investigación y construcción de teorías.				X	
SUB TOTAL						
TOTAL						

VALORACION CUANTITATIVA (Total x 0.20) : 19.

VALORACION CUALITATIVA : EXCELENTE

OPINIÓN DE APLICABILIDAD : APROBADO PARA SER APLICADO

Lugar y fecha: 25 de febrero 2020


 C.F. NESQUEN J. TASAYCO YATACO
 C.Q.P.P. 97102
 DNI: 21873096

FICHA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO POR JUICIO DE EXPERTOS.

I. DATOS GENERALES

- 1.1 Apellidos y nombres del experto: CHURANGO VALDEZ JAVIER
 1.2 Grado académico: MAESTRO EN FARMACOLOGIA
 1.3 Cargo e institución donde labora: DOCENTE

Título de la Investigación: Actividad antibacteriana *In vitro* del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

- 1.4 Autor del instrumento: UNIVERSIDAD INTERAMERICANA PARA EL DESARROLLO
 1.5 Nombre del instrumento: JUIICIO DE EXPERTOS UNID

INDICADORES	CRITERIOS CUALITATIVOS/CUANTITATIVOS	Deficiente 0-20%	Regular 21-40%	Bueno 41-60%	Muy Bueno 61-80%	Excelente 81-100%
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.					✓
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.				✓	
3. ACTUALIDAD	Adecuado al alcance de ciencia y tecnología.					✓
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.					✓
5. SUFICIENCIA	Comprende los aspectos de cantidad y calidad.					✓
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del estudio.					x
7. CONSISTENCIA	Basados en aspectos Teóricos-Científicos y del tema de estudio.					✓
8. COHERENCIA	Entre los índices, indicadores, dimensiones y variables.					✓
9. METODOLOGIA	La estrategia responde al propósito del estudio.					✓
10. CONVENIENCIA	Genera nuevas pautas en la investigación y construcción de teorías.					✓
SUB TOTAL						
TOTAL						

VALORACION CUANTITATIVA (Total x 0.20): 19
 VALORACION CUALITATIVA: EXCELENTE
 OPINIÓN DE APLICABILIDAD: APROBADO PARA SER APLICADO

Lugar y fecha: 25 de febrero 2020

Firma y Pos firma del experto [Firma] CAFF-00450

DNI: 07 403292

FICHA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO POR JUICIO DE EXPERTOS.**I. DATOS GENERALES**

- 1.1 Apellidos y nombres del experto: SAAVEDRA IZAGUIRRE MIGUEL ANTONIO
 1.2 Grado académico: QUIMICO FARMACEUTICO Y BIOQUIMICO ESPECIALISTA EN FARMACIA HOSPITALARIA
 1.3 Cargo e institución donde labora: QUIMICO FARMACEUTICO ASISTENCIAL HOSPITAL NACIONAL EDGARDO REBAGLIATI MARTINS ESSALUD

Título de la Investigación: Actividad antibacteriana *In vitro* del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta*

Risso (Lima) frente a Staphylococcus aureus ATCC 25923

- 1.4 Autor del instrumento: UNIVERSIDAD INTERAMERICANA PARA EL DESARROLLO
 1.5 Nombre del instrumento: JUICIO DE EXPERTOS UNID

INDICADORES	CRITERIOS CUALITATIVOS/CUANTITATIVOS	Deficiente 0-20%	Regular 21-40%	Bueno 41-60%	Muy Bueno 61-80%	Excelente 81-100%
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.				63	
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.				80	
3. ACTUALIDAD	Adecuado al alcance de ciencia y tecnología.				74	
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.				79	
5. SUFICIENCIA	Comprende los aspectos de cantidad y calidad.					90
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del estudio.					82
7. CONSISTENCIA	Basados en aspectos Teóricos-Científicos y del tema de estudio.					81
8. COHERENCIA	Entre los índices, indicadores, dimensiones y variables.					81
9. METODOLOGIA	La estrategia responde al propósito del estudio.				80	
10. CONVENIENCIA	Genera nuevas pautas en la investigación y construcción de teorías.				72	
SUB TOTAL					448	334
TOTAL						

VALORACION CUANTITATIVA (Total x 0.20): 78,2 %
 VALORACION CUALITATIVA: MUY BUENO
 OPINIÓN DE APLICABILIDAD: APLICABLE

Lugar y fecha: LUNES 25 DE FEBRERO 2020



CQFP:06931

Firma y Pos firma del experto
 DNI: 07754708