



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE  
LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y  
BIOQUÍMICA**

**TESIS**

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL  
ACEITE ESENCIAL DEL FRUTO *Citrus paradisi* ("TANGELO")  
FRENTA A *Staphylococcus aureus* IN VITRO.

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR:

CONSUELO ELIZABETH, MANTILLA RODRÍGUEZ

ASESOR:

MG.Q.F. FIDEL ERNESTO ACARO CHUQUICAÑA

HUACHO, PERÚ- MARZO 2018

## **DEDICATORIA**

La presente tesis está dedicada a mis hijos **KAROLINA** y **JAHIR**, por ser ellos mi gran motivación para cumplir mi meta, y a mi hermana **YOSELIN** por su apoyo incondicional en todo momento, he podido concluir mis estudios con dedicación, disciplina, disposición y perseverancia.

Finalmente a mis amigos con quienes conjuntamente nos hemos apoyado en el transcurso de esta difícil carrera y que hoy juntos gozamos la gratificación de llegar a la meta.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Alas Peruanas en especial a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y a todos mis docentes de mis x ciclos académicos.

A todo el personal del Hospital Huacho Huaura Oyón y Servicios Básicos de Salud.

Al C.D Barrera Cuba, Aarón por ser un excelente profesional que me apoyo en todo momento transmitiendo sus conocimientos y sabiduría para la realización de mi tesis.

# ÍNDICE

CARÁTULA.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS.....	VIII
ANEXOS.....	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	XIV
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
1.1 Descripción de la Realidad Problemática.....	15
1.2 Formulación del Problema.....	18
1.2.1. Problema General.....	18
1.2.2. Problemas Específicos.....	18
1.3 . Justificación e Importancia de la Investigación.....	19
1.3.1. Justificación de la Investigación.....	19
1.3.2. Importancia de la Investigación.....	20
1.3.3. Limitaciones de la Investigación.....	20
1.4 Objetivos de la Investigación.....	21
1.4.1. Objetivo General.....	21
1.4.2. Objetivos Específicos.....	21
1.5. Hipótesis de la Investigación.....	22
1.5.1. Hipótesis General.....	22
1.5.2. Hipótesis Específicos.....	22
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO.....	23
2.1 Antecedentes de la Investigación.....	23
2.1.1. Nacionales.....	23
2.1.2. Internacionales.....	26
2.2 Bases Teóricas.....	34
2.2.1 <i>Citrus paradisi</i> “Tangelo”.....	34

2.2.1.1 Clasificación Botánica .....	35
2.2.1.2 Descripción Geográfica .....	35
2.2.1.3. Composición química .....	36
2.2.1.4. Características.....	37
2.2.1.5. Propiedades.....	37
2.2.1.6. Metabolitos Activos.....	38
2.2.1.7. Actividad Antibacteriana de los Flavonoides.....	41
2.2.2. Antibiograma de Kirby Bauer. ....	43
2.2.2.1. Fundamento del Antibiograma de Kirby Bauer .....	45
2.2.2.2. Medio de Cultivo Líquido.....	45
2.2.3. Agar Müller-Hinton.....	49
2.2.3.1. Preparación del Agar Müller Hinton: .....	50
2.2.3.2 El pH del Agar Müller-Hinton:.....	51
2.2.3.3 Humedad en el Agar Müller Hinton: .....	51
2.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro:.....	51
2.2.4.1 Descripción de Género y Especie: .....	52
2.2.4.2 Factores de Virulencia:.....	52
2.2.4.3 Medios de Aislamiento: .....	53
2.2.4.4 Adquisición de <i>Staphylococcus aureus</i> :.....	53
2.2.4.5 Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> : .....	54
2.2.5 Aceite Esencial: .....	54
2.2.5.1. Propiedades Físicoquímicas de los Aceites Esenciales. .....	55
2.2.5.2. Actividad Antibacteriana de los Aceites Esenciales.....	56
2.2.5.3. Mecanismo de Acción de los Aceites Esenciales.....	57
2.2.6. Vancomicina .....	57
2.2.6.1 Historia.....	57
2.2.6.2 Farmacocinética .....	58
2.2.6.3. Mecanismo de Acción .....	59
2.2.6.4 Tratamiento.....	59
2.2.6.5. Identificación de Variables.....	59
2.3. Definición de Términos Básicos:.....	60
2.4. Operacionalización de Variables.....	62
CAPITULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	63
3.1 Tipo de Investigación:.....	63

3.2. Nivel de Investigación.....	64
3.3. Diseño de la Investigación.....	64
3.4. Población y Muestreo de la Investigación.....	64
3.4.1 Población.....	64
3.4.2. Muestra.....	64
3.4.3. Criterios de inclusión: .....	64
3.4.4. Criterios de exclusión: .....	65
3.5. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos .....	65
3.5.1.Técnicas: .....	65
3.5.2.Instrumentos:.....	65
3.5.2.1. Pie de rey .....	65
3.5.2.2. Regla milimetrada estándar .....	65
3.6. Materiales y equipos .....	66
3.6.1. Materiales.....	66
3.6.2. Equipos.....	66
3.7. Métodos y Recolección de Datos.....	67
3.8.Procedimiento.....	67
3.8.1.Obtención del Aceite Esencial .....	67
3.8.2 Tratamiento de la Materia Prima .....	68
3.8.3.Extracción del Aceite Esencial del <i>Citrus paradisi</i> . .....	69
3.8.4. Lavado, Esterilización y Empacado del Material:.....	69
3.8.4.1. Lavado.....	70
3.8.4.2. Empacado: .....	70
3.8.4.3. Esterilización: .....	71
3.8.5.Preparación del Agar Müeller Hinton :.....	71
3.8.5.1. Disolución del Medio de Cultivo Líquido:.....	72
3.8.5.2. Disolución del Aceite Esencial:.....	73
3.8.5.3. Procedimiento Microbiológico.....	73
3.8.5.4. Sembrado del Microorganismo:.....	73
3.8.5.5. Control Calidad del <i>Staphylococcus aureus</i> .....	74
3.8.5.6. Medición de los halos:.....	75
3.8.6. Procesamiento de Datos.....	76
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	77

4.1 Resultados.....	77
4.2 Análisis e Interpretación de Resultados .....	78
CAPITULO V: DISCUSIÓN.....	81
CAPITULO VI: CONCLUSIONES.....	85
CAPITULO VII: RECOMENDACIONES.....	87
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	89

## ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS.

TABLA N° 1.....	78
TABLA N° 2.....	79
TABLA N° 3.....	79
GRÁFICO N° 1.....	80
GRÁFICO N° 2.....	80



ANEXOS:.....	97
ANEXO N°1: Matriz de Consistencia.....	98
ANEXO N°2: Constancia de Determinación Botánica.....	99
ANEXO N°3: Constancia de Análisis Fito químico.....	100
ANEXO N°4: Solicitud de Permiso de Ingreso al Fundo.....	101
ANEXO N°5: Constancia de Extracción del Aceite Esencial.....	102
ANEXO N°6: Ficha de Recolección de Datos de Medida de Halo de Inhibición.....	103
ANEXO N°7: Constancia de Reactivación del Microorganismo.....	104
ANEXO N°8: Constancia de Proceso Microbiológico.....	105
ANEXO N°9: Fotos.....	106

## RESUMEN

El *Citrus paradisi* ("tangelo") es una planta perteneciente a la familia de los cítricos conocida en el Perú como tangelo a la cual se le atribuye efectos antibacterianos, antioxidantes, infecciones del tracto urinario, virales.

El aceite esencial se obtuvo de la cáscara (flavedo) utilizando un sistema de arrastre de vapor.

Además se reconoce al *Staphylococcus aureus* como el microorganismo más importante en las enfermedades oportunistas, actualmente se sabe que las plantas medicinales tienen múltiples beneficios médicos bien conocidos.

La presente investigación responde a un diseño experimental in vitro, de tipo analítico estadístico, y de nivel descriptivo.

**Objetivos:** Determinar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("tangelo"), en el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus*.

**Método:** Experimental, se obtuvo el aceite por destilación de arrastre de vapor utilizando concentraciones de (25%, 50% y 75%) del aceite esencial del fruto de *Citrus paradisi* ("tangelo"), tomando como control positivo a la Vancomicina 500mg ampolla se desarrolló mediante el método de antibiograma de Kirby Bauer, utilizando 30 placas Petri y se midieron los halos de inhibición formados alrededor de los discos embebidos con cada una de las concentraciones sobre la bacteria de *Staphylococcus aureus*.

**Resultados:** A través del método de antibiograma de Kirby Bauer (dilución en agar Müller Hinton), en 30 placas donde podemos demostrar las medidas de los halos de inhibición antibacteriana a las 48

horas La concentración de 25% del aceite esencial del fruto de *Citrus paradisi* ("tangelo") tiene mayor efecto inhibitorio con una media de 1.8mm positivo en los cultivos de la bacteria de *Staphylococcus aureus*, mientras que la concentraciones del 50% y 75% fue disminuyendo el efecto inhibitorio con diferencias significativas en los halos de inhibición en los cultivos de la bacteria de *Staphylococcus aureus*.

**Conclusión:** Existe efecto antibacteriano en el aceite esencial del fruto del *Citrus paradisi* ("tangelo"), inhibitorio positivo a la concentración de 25% presenta mayor efecto antibacteriano, y en las concentraciones de 50% y 75% va disminuyendo el efecto debido a la volatilidad que presenta los aceites esenciales, se podría asumir a los flavonoides como la sustancia responsable de la actividad antibacteriana, también cabe señalar que es extremadamente difícil correlacionar a un único compuesto debido a que los componentes pueden actuar sinérgicamente en el cultivo de la bacteria de *Staphylococcus aureus*.

**PALABRAS CLAVES:** *Citrus paradisi*, in vitro, Agar Müller Hinton, *Staphylococcus aureus*, aceite esencial, concentración mínima inhibitoria.

## ABSTRACT

*Citrus paradisi* ("tangelo") is a plant belonging to the citrus family known in the Peru as tangelo is attributed to which effects antibacterial, antioxidant, viral infections of the urinary tract. Essential oil obtained from the shell (flavedo) using a steam system. In addition to recognising the *Staphylococcus aureus* as the most important microorganism in opportunistic infections, currently it is known that medicinal plants have multiple well known medical benefits.

This investigation responds to an in vitro experimental design, statistical analytical type, and descriptive level.

**Objectives:** To determine the antibacterial effect in vitro of essential oil of the fruit of *Citrus paradisi* in growth of strains of *Staphylococcus aureus*.

**Method:** Using the method of antibiogram of Kirby Bauer (Müller Hinton agar dilution), 30 plates where we can demonstrate antibacterial inhibition matting measures 48 hours the concentration of 25% of the essential oil of the fruit of *Citrus paradisi* ("tangelo"), It has greater inhibitory effect with an average of 1.8 mm positive in *Staphylococcus aureus* bacteria cultured aureus, while the concentrations of 50% and 75% decreased the inhibitory effect with significant differences in the halos of inhibition in the cultivos of the bacterium of *Staphylococcus aureus*.

**Conclusion:** There is an antibacterial effect in the essential oil of the fruit of the *Citrus paradisi* ("tangelo"), positive inhibitory to the concentration of 25% has greater effect antibacterial, and in concentrations of 50% and 75% diminishes the effect due to volatility It presents the essential oils,

flavonoids might assume as the substance responsible for antibacterial activity, should also be noted that it is extremely difficult to correlate to a single compound since the components may act synergy in the culture of the bacterium of *Staphylococcus aureus*.

**KEY words:** *Citrus paradisi*, vitro, Müller Hinton Agar, *Staphylococcus aureus*, essential oil, minimum inhibitory concentration.

## INTRODUCCIÓN

La medicina es parte de la cultura de un pueblo, no hay pueblo, que no haya desarrollado algún sistema de medicina, es decir, un sistema ideológico o doctrinario acerca de la vida y la muerte, la salud y la enfermedad, y más concretamente sobre las causas de las afecciones, la manera de reconocerlas y diagnosticarlas, así como las formas o procedimientos para aliviar, curar o prevenir las enfermedades, y además para preservar y promover la salud.<sup>1</sup>

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS), la salud es un estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades. Es el bienestar biológico, psicológico, social y espiritual del individuo y de la comunidad.

En una nota descriptiva menciona que; la medicina tradicional es la suma completa de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas y que se utilizan para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales.<sup>2</sup>

La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales.

Los principios activos son ingredientes de los medicamentos herbarios que tienen actividad terapéutica, en el caso de los medicamentos herbarios cuyos principios activos hayan sido identificados, se debe normalizar su preparación, si se dispone de métodos analíticos adecuados, para que contengan una cantidad determinada de ellos, si no se logra identificar los principios activos, se puede considerar que todo el medicamento herbario es un solo principio activo.<sup>3</sup>

## **CAPITULO I:**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

#### **1.1. Descripción de la Realidad Problemática.**

En la actualidad, la medicina natural se ha convertido en un tema muy reconocido y usado a nivel de la población; es por ello que ha recibido mucha atención por parte de los científicos, quienes van descubriendo nuevas propiedades y compuestos de diferentes plantas y de esta manera pueda ser útil en diversos campos. <sup>1</sup>

Las plantas son importantes fuentes de productos naturales biológicamente activos con propiedades antibacterianas, por ello se estudiará en este proyecto al *Citrus paradisi* ( "Tangelo" ), mediante su extracción de aceites esenciales del flavedo (cáscara) del fruto que en rasgos generales, se cree que es eficaz frente varios microorganismos que se encuentran en nuestro organismo, por ejemplo tenemos: *Staphylococcus aureus*, *pseudomonas*, son bacterias responsables de muchas enfermedades siendo el principal microorganismo el *Staphylococcus aureus* el más patogénico y

causante de infecciones de la piel, neumonía, endocarditis y osteomielitis<sup>1</sup>.

Las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* son emergentes en múltiples regiones del mundo, y con una creciente resistencia a los antibacterianos, es una bacteria muy virulenta es considerado el principal patógeno responsable de la infecciones a nivel intrahospitalario, y comunitario habitualmente, se encuentra en la manos del personal de salud, en distintos materiales y artículos del ambiente hospitalario el cual también podrían transportar esta bacteria, convirtiéndole en potenciales reservorios y vehículos de transmisión entre pacientes.<sup>1</sup>

En Perú, como en otros países latinoamericanos, existen escasos reportes de la presencia de *S. aureus* en ambientes hospitalarios y comunitarios, sin embargo estas infecciones se pueden clasificar en procesos invasivos localizados en forúnculos, impétigo, sinusitis, otitis media, neumonía, mastitis, abscesos e infecciones de heridas.

La sepsis por cepas de *Staphylococcus aureus*, resistente a meticilina es un importante problema clínico y de salud pública mundial debido a que las opciones de tratamiento son reducidas, es por ello que se busca nuevas alternativas de tratamiento, para prevenir, controlar y evitar una epidemia mundial.<sup>36</sup>

En el presente estudio de investigación se evaluará el efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("Tangelo"), frente a *Staphylococcus aureus* in vitro, con el fin de implementar estrategias complementarias en el tratamiento de estas enfermedades, sabiendo que los fármacos tienen incidencia en reacciones adversas es por ello que se buscará demostrar que con este fruto accesible en el mercado puedan tener solución a las principales enfermedades causadas por esta bacteria.



### **1.1.1 Delimitación de la Investigación.**

### **1.1.2 Delimitación Temporal.**

La investigación se llevó a cabo desde Julio del 2017 hasta Diciembre de 2017.

### **1.1.3 Delimitación Geográfica**

La recolección de la muestra se realizó en el I fundo "SANTA ELENA" situado en Irrigación Santa Rosa en el distrito de Sayán provincia de Huaura Departamento de Lima.

Los ensayos farmacológicos de la determinación del efecto antibacteriano y el proceso microbiológico se realizaron en las instalaciones del laboratorio de la Escuela Académica Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Alas Peruanas Filial Huacho-en el año 2017 Ubicada en Av. Jorge Chávez s/n Hualmay –Huacho.

### **1.1.4 Delimitación Conceptual**

Determinación del efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("Tangelo") frente a *Staphylococcus aureus* in vitro.

### 1.1.5 Delimitación Social

Este proyecto se realizó con el fin de aportar nuevos tratamientos alternativos en la medicina actual, específicamente en el aceite esencial del fruto de *Citrus paradisi* ("Tangelo"), frente a la bacteria de *Staphylococcus aureus* y así una nueva alternativa para la población sabiendo que en estos últimos años hay mayor aceptación en relación a la medicina natural todo esto será debido a las evaluaciones, resultados y accesos que se obtendrán de esta investigación.

## 1.2 Formulación del Problema

### 1.2.1 Problema General

¿Presentará efecto antibacteriano el aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("Tangelo") frente a *Staphylococcus aureus* in vitro?

### 1.2.2 Problemas Específicos

- ¿Presentará efecto antibacteriano el aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("Tangelo"), al 25% frente a *Staphylococcus aureus* in vitro?
- ¿Presentará efecto antibacteriano el aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("Tangelo"), al 50% frente a *Staphylococcus aureus* in vitro?

- ¿Presentará efecto antibacteriano el aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* (“Tangelo”), al 75% frente a *Staphylococcus aureus* in vitro?

### **1.3. Justificación e Importancia de la Investigación.**

#### **1.3.1 Justificación de la Investigación**

Las plantas medicinales son consideradas importantes fuentes de productos naturales activos que se constituyen en precursores para la síntesis de fármacos.

##### **a) Justificación Teórica**

La presente investigación se justifica aportando al conocimiento científico la existencia de una planta no muy conocida pero con múltiples propiedades medicinales en lo que se destaca evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* (“Tangelo”) frente a *Staphylococcus aureus* in vitro a distintas concentraciones, la cual sería una alternativa curativa en el tratamiento en distintas enfermedades.

##### **b) Justificación Práctica**

La solución propuesta ayudará como medida curativa contra las enfermedades de origen bacteriano por *Staphylococcus aureus* dando un aporte curativo a la medicina natural o complementaria presentando las gotas del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* “Tangelo”.

### **c) Justificación Metodológica**

Porque el método de control para la salud se basa en evaluaciones confiables frente a diversos microorganismos principalmente en las bacterias de *Staphylococcus aureus* in vitro, se aportará nuevos conocimientos a futuras investigaciones.

#### **1.3.2 Importancia de la Investigación.**

En este trabajo de investigación se determinará la efectividad antibacteriana del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* (“Tangelo”), para ello se realizará una comparativa de las diferentes concentraciones frente a las bacterias de *Staphylococcus aureus* in vitro, para lo cual se llevará a cabo un análisis experimental en el laboratorio de la Universidad Alas Peruanas como parte del trabajo de investigación en la culminación de mi carrera profesional de Farmacia y Bioquímica, es de vital importancia que las evaluaciones y resultados estén al alcance de la población para su información y aplicación.

#### **1.3.3 Limitaciones de la Investigación**

- Escaso material bibliográfico en el Perú de investigaciones relacionadas directamente a determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial del *Citrus paradisi* (“tangelo”), sobre las bacterias de *Staphylococcus aureus*.

- La falta de presupuesto, para obtener diferentes bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *listeria monocytogenes*, y evaluar sus diferentes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)
- Es un limitante los equipos de laboratorios que se requieran para medir los resultados de la investigación experimental.

## **1.4 Objetivos de la Investigación.**

### **1.4.1 Objetivo General**

- Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("Tangelo") frente a la bacteria de *Staphylococcus aureus* in vitro.

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- Evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("Tangelo"), al 25% frente a *Staphylococcus aureus* in vitro.
- Evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("Tangelo"), al 50% frente a *Staphylococcus aureus* in vitro.
- Evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("Tangelo"), al 75% frente a *Staphylococcus aureus* in vitro.

## **1.5. Hipótesis de la Investigación.**

### **1.5.1. Hipótesis General**

- El aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* (“Tangelo”) presenta un alto nivel de eficacia antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* in vitro.

### **1.5.2. Hipótesis Específicas**

- El aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* (“Tangelo”) al 25% de concentración, presenta un alto nivel de eficacia antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* in vitro.
- El aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* (“Tangelo”) al 50% de concentración presenta un alto nivel de eficacia antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* in vitro.
- El aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* (“Tangelo”) al 75% de concentración presenta un alto nivel de eficacia antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* in vitro.

## CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes de la Investigación.

#### 2.1.1 Nacionales:

- En el año 2014, Mercado, M., realizó un estudio de “Sensibilidad de *pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a concentración de aceite de *Citrus reticulata* variedad satsuma “mandarina”.  
**Objetivo:** Fue determinar la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a diferentes concentraciones del aceite de *Citrus reticulata*, variedad Satsuma “mandarina”.  
**Método:** Experimental el aceite se obtuvo por el método de destilación por arrastre con vapor de agua, a partir del flavedo de la mandarina y para determinar la sensibilidad

antibacteriana se emplearon cultivos de *S. aureus* y de *P. aeruginosa*. La sensibilidad de estos microorganismos se determinó por el método de difusión en agar utilizándose concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100% de aceite. Se utilizó la Vancomicina y Ciprofloxacino como controles para *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente. **Resultados:** Se encontró que *S. aureus* y *P. aeruginosa* presentaron mayor sensibilidad a las concentraciones 60, 80 y 100% de aceite de *C. reticulata* variedad Satsuma “mandarina”. También se determinó que *P. aeruginosa* es más sensible a Ciprofloxacino que a las concentraciones del aceite mientras que *S. aureus* presentó mayor sensibilidad a la concentración del 100% de aceite que al control positivo (Vancomicina) ya que formó un halo de sensibilidad de mayor tamaño que al antibiótico.

**Conclusión:** El autor concluyó que las bacterias en estudio son sensibles al aceite esencial de *C. reticulata* variedad Satsuma “mandarina.”<sup>2</sup>

- En el año 2016, Saldarriaga, A., realizó una investigación titulada. “Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial de *Citrus sinensis* (Naranja) variedad Tangelo en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*.” **Objetivo:** La Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial de *Citrus sinensis* (Naranja) variedad Tangelo en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*. **Método:** Experimental el aceite se obtuvo por destilación de arrastre con vapor de agua a partir del flavedo de la



naranja, los cultivos empleados para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) fueron: *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*.

**Resultados:** La CMI se determinó con el método de Macro dilución en caldo utilizando 8 concentraciones; dando como promedio el 3.8% frente *Staphylococcus aureus* y un promedio el 8.7 % del aceite esencial frente *Escherichia coli*. La CMB se obtuvo por el método de siembra en superficie en agar nutritivo; los promedios fueron 7.2% para *Staphylococcus aureus* y 12.3% del aceite esencial para *Escherichia coli*.

**Conclusión:** El autor concluyó que el aceite esencial de *Citrus sinensis* (Naranja) variedad Tangelo resultó tener un mayor efecto antibacteriano en los cultivos de *Staphylococcus aureus* que en los cultivos de *Escherichia coli*.<sup>3</sup>

- En el año 2015, Vargas, D., realizó un trabajo de investigación titulado. “Efecto del aceite esencial de *Citrus sinensis* contra *Listeria monocytogenes*”. **Objetivo:** Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus sinensis* contra *Listeria monocytogenes*. **Método:** Experimental para la obtención del aceite se utilizó el método de destilación por arrastre de vapor de agua, a partir del flavedo de la naranja. **Resultados:** Se determinó el efecto antibacteriano para este microorganismo por el método de difusión en agar utilizándose concentraciones de 20%,40%,60%,80% y 100% de aceite utilizando la Gentamicina y

Sulfametoxazol Trimetropin como controles para la *Liseria monocytogenes*.

**Conclusión:** El autor concluyó que la concentración al 100% de aceite de *Citrus sinensis*, presento mayor efecto antimicrobiano en relación a las demás concentraciones contra *Liseria monocytogenes* a demás presento igual actividad antibacteriana que Gentamicina; pero mejor efecto antibacteriano que Sulfametoxazol Trimetropin.<sup>4</sup>

### 2.1.2 Internacionales:

- En el año 2015, Da Silva, A., realizó un trabajo titulado "Determinación de la actividad antibacteriana de tres variedades de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck, *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación con *Citrus reticulata* y *Citrus medica* L.) Frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*." **Objetivo:** Fue obtener el aceite esencial y macerado de la hoja, cáscara y semilla de limón **Método:** Experimental, el método utilizado fue de destilación por arrastre de vapor para el aceite esencial de hojas, cascara y semillas de limón en cuanto a la maceración se utilizó las cáscaras hojas y semilla en alcohol absoluto por 2 días. **Resultados:** Los resultados obtenidos demuestran que frente a *Staphylococcus aureus* el aceite esencial y el macerado obtenido de hoja y cáscara de las tres variedades presenta actividad antibacteriana y no de la semilla, y frente a *Escherichia coli* el aceite esencial obtenido de la hoja de las tres variedades presenta actividad antibacteriana, y no de la semilla.

**Conclusión:** El autor concluyó que la variedad *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación *Citrus reticulata* y *Citrus* médica (L) presenta actividad de la cáscara, el macerado frente a *Escherichia coli* no presenta actividad antibacteriana.<sup>5</sup>

- El año 2014, Macías S., realizó un estudio titulado “Proceso de Obtención de Extracto a partir de la Semilla de la Toronja (*Citrus Paradisi*) y su Aplicación en Desinfección de Vegetales o Frutas y Superficies Planas.” **Objetivo:** Fue contrarrestar la presencia de bacterias y gran parte de hongos como los mohos y levaduras presentes en los alimentos que producen enfermedades gastrointestinales como salmonelosis, cólera, amebiasis, shigelosis y disentería y otras enfermedades que afectan el aparato digestivo. **Método:** Experimental, se obtiene un extracto a partir del desecho de una fruta que es la semilla de la toronja, que será usado como desinfectante orgánico para frutas y vegetales, la semilla obtenida de la fruta de la toronja del árbol del pomelo, es rica en flavonoides predominando la naringina, estos elementos fitoquímicos son eficaces para combatir 800 tipos de bacterias y un gran número de parásitos nocivos para la salud humana. **Resultados:** Se obtiene el extracto de la semilla de la toronja por una extracción lenta y prolongada que consiste en la maceración de la semilla previamente secada y molida, a 25°C de temperatura usando como solvente el etanol, el producto obtenido de la maceración es filtrado y concentrado para separar el extracto de la semilla de la toronja del solvente.

El extracto de la semilla de toronja fue analizada microbiológicamente a diferentes concentraciones para determinar su efectividad como un desinfectante bactericida y aplicarlo en el uso de desinfección de frutas y vegetales dando como resultado un valor de cero en UFC/ml, tanto en bacterias aerobios mesófilos como en moho y levaduras.

El extracto de la semilla de toronja fue aplicada en los alimentos más tradicionales en la cual no se acostumbra a pelar para consumirla, como son las uvas, frutillas y tomates; se les hizo un análisis microbiológico de un antes y después de lavarlos con agua potable y luego desinfectados con el extracto de la semilla de la toronja diluido en agua de clorada.

**Conclusión:** El autor concluyo que teniendo resultados muy comparativos desde una carga microbiana incontables a una carga reducida en aerobios mesofilos de 250, 1400 y 100 UFC/cm<sup>2</sup> en uvas, frutillas y tomates respectivamente; en moho y levadura de 0, 145 y 130 UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente.<sup>6</sup>

- En el año 2014, Coello, S., realizó una investigación titulada “Evaluación del Rendimiento en la Determinación de aceite esencial y pectina de tres cítricos limón “Chino”, Mandarina “Criolla” y Toronja “Blanca”. **Objetivos:** 1. Establecer parámetros físicos-químicos y nutricionales del fruto de limón chino, mandarina criolla y toronja blanca en dos estados de maduración. 2. Determinar parámetros de calidad del aceite esencial del flavedo de limón chino, mandarina criolla y toronja blanca en base a su rendimiento, características cromatografías y estado

de maduración. 3. Obtener pectina del flavedo residual de limón chino, mandarina criolla y toronja blanca, reduciendo el tiempo de hidrólisis acida en la extracción.

**Método:** Experimental, los tratamientos constituidos por tres variedades de cítricos en dos estados de madurez, según el diseño de bloques completamente al azar, en el físico-químico 2 repeticiones y en el de la pectina 3 repeticiones. Las variables medidas fueron, diámetro ecuatorial, diámetro polar, peso unitario, volumen, densidad, contenido de jugo, rendimiento de jugo, peso de semillas, número de semillas, pH, grados brix, acidez, titulable, índice de madurez, materia seca, humedad, ceniza, proteína, extracto etéreo, extracto libre de nitrógeno, vitamina C, azúcares totales, azúcares reductores, calcio, fósforo, magnesio, potasio, sodio, para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey al 5% de probabilidades.<sup>7</sup>

**Resultados:** En cuanto a los resultados obtenidos, el mayor contenido de jugo se presentó en el T6 que corresponde a la Toronja Blanca en estado de madurez, maduro con 109.52 ml, los parámetros químicos.

**Conclusión:** El autor concluyo que el mejor estado de madurez para la obtención de jugo es el estado verde, que están dentro los parámetros del INEN. Al final se evaluó el aceite esencial mediante una cromatografía de gas. En cuanto a la pectina los valores más altos de obtención de la misma fueron en la cáscara de los frutos en estado maduro.<sup>7</sup>

- En el año 2013, Hallo O., realizó una investigación titulada “Estudio Físico-Químico y Cromatográfico comparativo del fruto de naranja variedades Valencia (*Citrus Sinensis*) y Tangelo (*Citrus Paradisi* x *Citrus Reticulada*) en dos estados de madurez proveniente del Cantón “Las Naves”. **Objetivo:** Analizar las variaciones físicas del fruto, químicas del jugo y cromatografías del aceite esencial, extraído del flavedo de los cítricos, variedad Valencia (*Citrus sinensis L*) y Tangelo (*Citrus paradisi* x *Citrus reticulata*), comparando con un testigo, la naranja-mandarina King (*Citrus nobilis* Lour); **Método :** Experimental, estos frutos fueron cosechados en estado dos estados de madurez (verde - maduro) de la plantación establecida en la Hacienda “Estefanía” del recinto “Las Mercedes”, Cantón “Las Naves” provincia de Bolívar. Para las variables físicas y químicas se tomaron 20 frutos por planta en 27 zonas de la plantación obteniéndose un total de 540 frutos; en los parámetros físicos, se determinó que la variedad Tangelo supera en los diámetros, peso y volumen de jugo a Valencia y al testigo; en el rendimiento de jugo la Valencia obtiene 50% superando a Tangelo y testigo, los parámetros químicos. **Resultados:** Se determinó que la Valencia y Tangelo están dentro de los parámetros INEN en pH; sólidos solubles y acidez, la Valencia presenta los mayores porcentajes de cenizas, proteína y vitamina C, extracto etéreo; las variedades Valencia, Tangelo y el testigo tienen valores del 10 al 12%, las kilocalorías se presentan mayormente en Tangelo. Los macro-elementos principales, en Valencia presentó una leve disminución al pasar de estado de madurez en Ca, P, K y Na, y un incremento en Mg, mientras que, Tangelo

registró un aumento en P, Mg, K y Na, disminuyendo en Ca; las variedades Valencia y Tangelo superaron en todos los macro-elementos al testigo; en parámetros Cromatográfico.

**Conclusión:** El autor determinó que Valencia, Tangelo y el testigo, al pasar de estado de madurez la cantidad de Limoneno se incrementa levemente, mirceno solo se incrementa en Valencia, en Tangelo se mantiene y superan al testigo, en Valencia y Tangelo el linalol disminuye levemente superando al testigo, en Tangelo el  $\gamma$ -terpineno disminuye y supera a Valencia y al testigo, en Valencia y Tangelo el para-cimeno disminuye, superando al testigo King que solo contiene trazas, el rendimiento de aceite esencial en Valencia, Tangelo y el testigo King registraron una disminución al pasar del estado verde a maduro.<sup>8</sup>

- En el año 2011, Aristizabal, G., realizó una investigación titulada “Evaluación de la actividad anti fúngica de los extractos de las cáscaras y semillas de tres especies de cítricos contra el hongo Fito patógeno *Fusarium Roseum*”. **Objetivo:** Evaluar la actividad anti fúngica de extractos etéreos y etanólicos de cáscaras y semillas de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulada*) y toronja (*Citrus máxima*) contra el hongo Fito patógeno *Fusarium roseum*, causante de varias enfermedades en diferentes cultivos, principalmente en clavel. **Método:** Experimental, se utilizó éter de petróleo para obtener los extractos apolares, y etanol para obtener los extractos polares. Posteriormente se realizaron pruebas químicas

preliminares y cromatografías en capa delgada para caracterizar los metabolitos secundarios presentes en los extractos. **Resultados:** Se evaluó la actividad anti fúngica de los extractos utilizando el método de discos de papel, probando tres diferentes concentraciones de los extractos (50.000, 100.000 y 500.000ppm) sobre *F. roseum*. Se encontraron varios tipos de metabolitos secundarios en los extractos, como flavonoides, fenoles, terpenos y glucósidos, pero a pesar de esto ningún extracto presentó inhibición frente a *F. roseum* posiblemente a los mecanismos de resistencia que este hongo presenta, a la metodología utilizada y la ausencia de algunos metabolitos anti fúngicos como alcaloides.

Para la elaboración del insecticida botánico se utilizó semillas de naranja, cuyos componentes tienen propiedades insecticidas, los cuales se extrajeron mediante el uso de alcohol al 90%, 70%, 50%, alcohol de farmacia y agua destilada. El ensayo estuvo formado por 216 plantas de nogal (*Juglans neo trópica*) dispuestas en el campo en un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA) con tres repeticiones, cada una con 6 tratamientos conformados por 12 plantas, antes de aplicar el insecticida biológico en las plantas se determinó el porcentaje de incidencia de insectos plaga en cada una de ellas, de esta manera se tuvo que las plantas de nogal estaban siendo afectadas por: pulgón verde, trips (*Frankiniella occidentalis*), mosca blanca, lorito verde y orugas.

**Conclusión:** El autor concluye que el análisis estadístico de varianza (ADEVA) y Duncan al 5 %, que demostraron que t5 (dilución de 5cm<sup>3</sup> de extracto de semillas en alcohol al 70% en 1 L de agua) fue el más



eficiente en el control de insectos plaga, seguido por t4 (dilución de 5cm<sup>3</sup> de extracto de semillas en alcohol al 50% en 1 L de agua).<sup>9</sup>

- En el año 2010, Escobar, B., realizó una investigación titulada “Extracción de compuestos fenólicos de las Cáscaras de Cítricos Producidos en México. **Objetivo:** Fue extraer y cuantificar el contenido fenólico de las cáscaras de siete cítricos cultivados en México, así como su Actividad Antioxidante (AA). **Método:** Experimental, esto se determinó por el mejor método evaluando el sistema de extracción de los compuestos fenólicos mayoritarios, teniendo como variables la temperatura de extracción, la concentración del disolvente (etanol), y el tiempo de extracción. **Resultados:** La determinación de Actividad antibacteriana (AA) se realizó mediante el método de blanqueamiento del  $\beta$ -caroteno, utilizando BHT como antioxidante de referencia. La identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios se realizó mediante la técnica de HPLC. El mejor modelo de extracción de los compuestos fenólicos mayoritarios fue con una concentración de disolvente (Etanol) al 96% a temperatura de reflujo (76°C), realizando tres extracciones de una hora.

En los resultados el valor más alto de AA se observó en los extractos de limón mexicano y naranja valencia (79.41 y 76%, respectivamente). La naranja agria presentó un mayor contenido fenólico seguida de la lima y el limón mexicano (25, 14 y 12 g/100g b.s., respectivamente).

**Conclusión:** El autor concluyo e identificó la naringina en todos los cítricos, la hespérida se identificó en todos los cítricos, a excepción de la toronja. La naranja agria y la toronja presentaron el contenido más alto de naringina (4280 y 3145 mg/100g).<sup>10</sup>

## 2.2 Bases Teóricas

### 2.2.1 *Citrus paradisi* “Tangelo”.

Tangelo (*Citrus paradisi* x *citrus reticulata*). Son híbridos de mandarina (*C. reticulata* Blanco) y pomelo (*C. paradisi* Macf.) y cuyo nombre combina el de sus parentales: Tangerina y pomelo, desarrollado por investigadores del Departamento de Agricultura y Horticultura de la Estación de Investigación en Orlando de Estados Unidos. Los más importantes, Minneola, de maduración tardía, y Orlando, de maduración precoz, ambos híbridos de pomelo Duncan x mandarina Dancy, su comportamiento agronómico es adecuado, vegetando bien y dando elevadas cosechas de frutos de buen tamaño. (Agustín, 2003).<sup>11</sup>

Según Ray y Walheim, (1980) los Tangelo son híbridos provenientes del cruzamiento de mandarinos con toronjas, o de mandarinos con pomelos. Y su nombre se deriva de sus progenitores, según las variedades de mandarino, pomelo o toronja. Son más grandes que las mandarinas tienen gran parte del sabor deseable de la mandarina.<sup>11</sup>

### 2.2.1.1 Clasificación Botánica

**Tabla 1:** Taxonomía

Nombre científico:	<i>Citrus paradisi</i>
Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Sapindales</i>
Familia:	<i>Rutaceae</i>
Género:	<i>Citrus</i>
Especie:	<i>Citrus reticulata blanco</i>
Nombre vulgar:	Tangelo

**Fuente:** Determinación botánica de la UNMSM. (Anexo 2)

### 2.2.1.2 Descripción Geográfica

El origen de la mayoría de las especies de cítricos no se conoce con exactitud, debido a que se han utilizado y diseminado por el hombre desde hace muchos años, sobre todo en Asia, que es considerado el continente de origen. Se cree que varias de ellas provienen de las faldas del Himalaya en el noroeste de la India.

El tangelo es una especie que pertenece al género citrus desempeñan un papel destacado en la alimentación de muchas personas en el mundo entero, una característica de esta planta es la presencia en todos los órganos un aceite esencial que le da un olor característico.

Los más importantes, Minneola, de maduración tardía, y Orlando, de maduración precoz, ambos híbridos de pomelo Duncan x mandarina Dancy, su comportamiento agronómico es adecuado, vegetando bien y dando elevadas cosechas de frutos de buen tamaño. <sup>13</sup>

### 2.2.1.3. Composición química

**Tabla 02:** Protocolo de Análisis del fruto *Citrus paradisi*.

PRUEBAS	ESPECIFICACIONES	METODOS	RESULTADOS
	Marcha	Fitoquímica	
<b>Antocianinas</b>	Alcohol amílico	Cualitativa	-
	Dragendorff	Cualitativa	+
<b>Alcaloides</b>	Mayer	Cualitativa	-
	Wagner	Cualitativa	-
<b>Lactonas</b>	Baljet	Cualitativa	-
<b>Flavonoides</b>	Shinoda	Cualitativa	+
<b>Cardenólidos</b>	Kedde	Cualitativa	-
<b>Esteroides</b>	Lieberman-burchard	Cualitativa	-
<b>Saponinas</b>	Espuma	Cualitativa	+
<b>Taninos</b>	Cloruro férrico	Cualitativa	-
<b>Triterpenos</b>	Lieberman-burchad	Cualitativa	-
<b>Azúcares red.</b>	Fehling	Cualitativa	+++
<b>Fenoles</b>	Cloruro férrico	Cualitativa	-

**Fuente:** Protocolo de Análisis de la UNMSM. (Anexo 3).

#### 2.2.1.4. Características

- Híbrido de mandarina y pomelo.
- Árbol vigoroso con forma redondeada.
- Ramas con tendencia inclinada.
- Gran densidad de hojas de color verde claro.
- Frutos de piel fina con cierta dificultad para pelar, de color naranja intenso.<sup>13</sup>

#### 2.2.1.5. Propiedades

Los compuestos presentes en *Citrus paradisi* (“tangelo”) planta rica en principios activos, presenta acción sobre casi todos los órganos del cuerpo humano. Al tener un alto contenido en aceites esenciales cuyos ingredientes activos son flavonoides, ácidos fenólicos y principios amargos que genera una acción tónica y estimulante sobre el sistema nervioso, circulatorio, efectos antioxidantes, antiinflamatorios.<sup>14</sup>

Entre las principales propiedades podemos mencionar las siguientes:

- Contiene una cantidad moderada de hidrato de carbono.
- Su valor calórico es bajo (tiene alrededor de 32 calorías).
- Es una fuente de vitamina C y su alto contenido de ácidos orgánicos entre ellos tenemos: cítrico, málico, oxálico y salicílico.<sup>14</sup>

**Tabla 03:** Valor Nutritivo del Citrus *paradis*"tangelo"<sup>14</sup>

<b>Nutrientes-100g</b>	<b>Valor</b>
<b>Humedad</b>	86.8 %
<b>Proteína</b>	0.94 g
<b>Grasa</b>	0.12 g
<b>Carbohidratos</b>	11.8 mg
<b>Fibra dietética</b>	2.4 g
<b>Ca</b>	40 mg
<b>Ácido fólico</b>	30.3 mg
<b>Vitamina C</b>	53.2 mg

**Fuente:** Generalidades de los Citricos.<sup>14</sup>

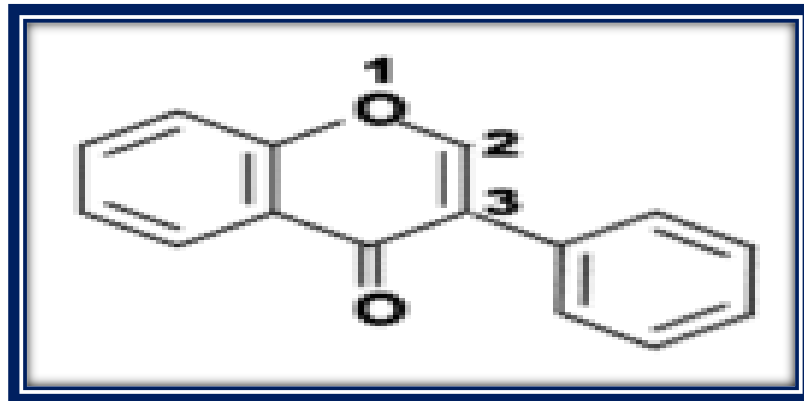
#### 2.2.1.6. Metabolitos Activos

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales se debe a la presencia de las sustancias bioactivas: <sup>24</sup>

- **Flavonoides:** Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligado a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). <sup>14</sup>

Son muchas las actividades biológicas asociadas a estos compuestos, además se han descrito como antiinflamatorios y analgésicos, antioxidantes, antitumorales, antibacteriano, así como relacionadas con el sistema cardiovascular.<sup>33</sup>

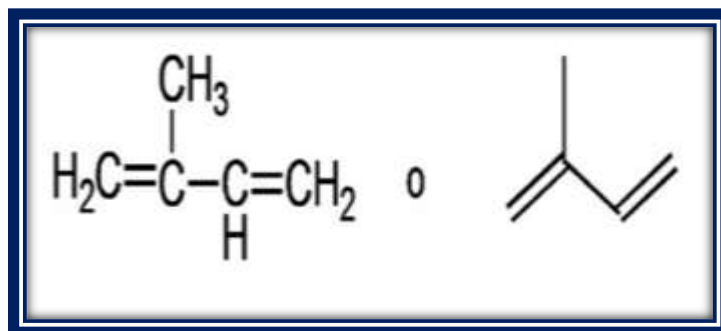
**Figura 01: Estructura Química de los Flavonoides**



**Fuente:** Química y actividad biológica de los flavonoides.<sup>35</sup>

- **Terpenos:** Constituyen un grupo de metabolitos secundarios formados por 5 átomos de carbono, son compuestos volátiles, se les conoce también como isoprenoides.<sup>32</sup>

**Figura 02: Estructura Química de los terpenos**

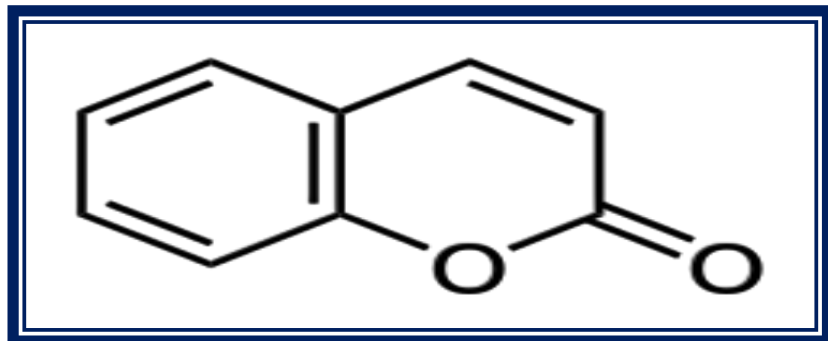


**Fuente:** Química y actividad biológica de los flavonoides.<sup>35</sup>

- **Cumarinas:** Conocidas como benzopironas, son una familia de compuestos de origen natural y sintético que han suscitado desde mucho tiempo un gran interés debido a sus posibles aplicaciones biológicas.

Debido a la gran variedad estructural de estas moléculas son muchas las propiedades farmacológicas asociadas a dicho anillo, entre otras: antibacterianas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antivirales, antihelmínticas, antioxidantes, o inhibidoras enzimáticas.<sup>33</sup>

**Figura 03: Estructura Química de la Cumarina.**

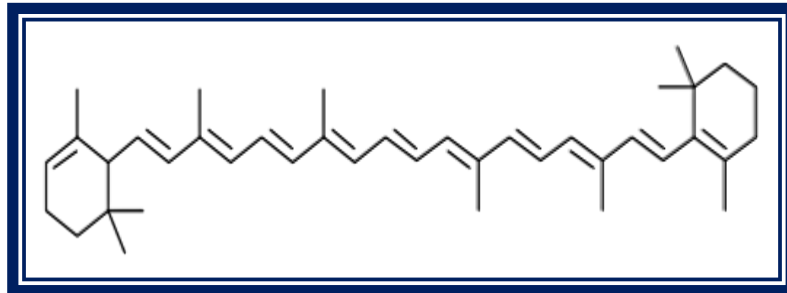


**Fuente:** Química y actividad biológica de los flavonoides.<sup>35</sup>

- **Carotenos:** Son compuestos naturales presentes en diversas estructuras de plantas y en gran variedad de animales, hongos y bacterias. Son responsables del color de las flores y frutos.<sup>34</sup>



**Figura 04: Estructura Química de los Carotenos**



**Fuente:** Química y actividad biológica de los flavonoides.<sup>35</sup>

### **2.2.1.7 Actividad Antibacteriana de los Flavonoides.**

Los flavonoides son sintetizados de las plantas en respuesta a la infección microbiana; por lo tanto se han encontrado in vitro al ser sustancias antibacterianas eficaces contra una amplia variedad de microorganismos.

Diferentes plantas ricas en flavonoide que se extrae de diferentes especies se han divulgado por poseer actividad antibacteriana, varios flavonoides como la naringina, apigenina, galangina, flavona y flavonol glucósidos, isoflavonas, flavanonas y chalcones han demostrado poseer potentes actividad antibacteriana en la membrana celular, en un lugar específico de acción.

Sus acciones moleculares forman complejos con las proteínas a través de fuerzas no específicas tales como hidrógeno y efectos hidrófobos, así como la formación de enlace covalente. Por lo tanto, puede estar relacionada con

su modo de acción antibacteriana y su capacidad para inactivar adhesinas bacterianas, enzimas, proteínas de transporte de la célula.

Los flavonoides pueden intercalar o formar enlaces de hidrógeno con el apilamiento de bases de ácidos nucleicos y además conducir a la inhibición de la ADN y síntesis de ARN en bacterias.

La naringina es un flavonoide que se encuentra en gran porcentaje en los *Citrus* (naranja, tangelo, mandarina, toronja, pomelo) etc., tienen intensiva actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y los *estreptococos*. Una alteración de fluidez de la membrana en lipofílicos e hidrofílicos de las colonias, pueden atribuirse a este efecto que sugiere que estos flavonoides podrían reducir la fluidez del exterior y capas internas de las membranas.

La correlación entre soportes de interferencia de actividad antibacteriana en la membrana celular y la teoría de que los flavonoides pueden demostrar actividad antibacteriana mediante la reducción de la fluidez de la membrana de las células bacterianas.<sup>35</sup>

- **Efecto Antibacteriano**
- Acción capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o su eliminación sin dañar el organismo infectado, como los antibióticos.<sup>16</sup>

- Se refiere a una sustancia cuyas propiedades son capaces de eliminar agentes bacterianos o la inhibición de su crecimiento o proliferación sin incurrir en el daño del objeto, ambiente u organismo que lo porta. Son fármacos como es el caso de los antibióticos u otros agentes químicos capaces de combatir estos cuerpos.<sup>17</sup>

### **2.2.2. Antibiograma de Kirby Bauer.**

Los antibiogramas son métodos in vitro que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antibacterianos, bajo condiciones de laboratorio específica y estandarizada. No obstante, la correlación exacta entre los resultados in vitro y la respuesta clínica es muchas veces difícil de predecir, ya que existen numerosos factores que influyen la interacción de los agentes antibacterianos y los microorganismos en un determinado paciente.<sup>18</sup>

Entre los factores podemos resaltar:

#### **a). Factores del agente antibacteriano.**

- Farmacocinética
- Unión a proteínas del plasma
- Vías de administración
- Acción bacteriostática o bactericida
- Concentración en el sitio de la infección.

#### **b). Factores del Huésped**

- Enfermedad
- Estado inmunológico
- Formación de absceso
- Presencia de cuerpo extraño.

- Función renal y hepática
- Cumplimiento del tratamiento.

### **c). Factores del Microorganismo**

- Virulencia.
- Alta concentración de microorganismos.
- Infección mixta.
- Desarrollo de resistencia durante el tratamiento.

La metodología para realizar el antibiograma toma en consideración algunos de estos factores para determinar más eficientemente cómo un microorganismo podría responder in vivo a un determinado antibiótico.

Existen diversos métodos para determinar la sensibilidad bacteriana a los antibióticos, presentando además cada uno de estos métodos, múltiples variantes.

Cualquiera que sea el método seleccionado, el medio de cultivo a emplear ha de ser aquel que permita un buen desarrollo del microorganismo cuya sensibilidad se determina y además no debe ejercer ningún efecto inhibitor sobre la actividad antibacteriana de los antibióticos ensayados.

Usualmente se utiliza el agar de Müller-Hinton en las pruebas de sensibilidad de microorganismos aeróbicos de rápido crecimiento. Cuando se trata de estreptococos, *Staphylococcus aureus* u otros microorganismos.

De los métodos existentes, el más popular es el del disco de papel, la variante más utilizada de este método es la de Kirby

Bauer, la cual consiste en utilizar una sola concentración de antibiótico y medir el tamaño de la zona de inhibición.<sup>18</sup>

#### **2.2.2.1. Fundamento del Antibiograma de Kirby Bauer**

En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico.

Las placas se incuban por 16-18 horas a 35- 37°C.

Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco.<sup>18</sup>

En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al *Staphylococcus aureus*. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo el Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica.<sup>18</sup>

#### **2.2.2.2. Medio de Cultivo Líquido**

Para la determinación del antibiograma disco placa en *Staphylococcus*, *enterococcus*, entero bacterias y bacilos Gram-negativos no fermentadores utilizamos el siguiente procedimiento.

Una forma muy útil de poder aislar, identificar y conservar los microorganismos es mediante el uso de medios de cultivo, inicialmente ideados por Pasteur (que como ya sabemos se considera el padre de la microbiología), quien se dio cuenta que los microorganismos podían crecer en soluciones que tuvieran azúcar y una fuente de nitrógeno.<sup>18</sup>

#### **a). Preparación del inóculo en medio de cultivo líquido:**

En la actualidad, la mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados; normalmente bajo la forma de liofilizados a los que es preciso rehidratar.

En estos casos la preparación del medio de cultivo se reduce sencillamente a pesar la cantidad deseada del mismo y disolverla en agua destilada siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sustancias termolábiles, se esterilizan por filtración y se añaden al resto de los componentes después de que estos hayan sido previamente esterilizados en la autoclave y enfriados a temperatura ambiente o a 40-50°C si se trata de medios con agar. Antes de su esterilización los medios líquidos se reparten en los recipientes adecuados (tubos, matraces, etc.). Si es un medio sólido y se ha de distribuir en tubos o en matraces será necesario fundir el agar en baño María u horno microondas, una vez fundido y homogenizado, se distribuye en caliente a los tubos o matraces (no en placas Petri) se tapa y se esteriliza en la autoclave. Una vez finalizada la esterilización los medios se dejarán enfriar a temperatura ambiente<sup>18</sup>.

## **b). Inoculación de las placas:**

En microbiología se entiende por "siembra" la operación que consiste en depositar un germen asépticamente en un medio de cultivo.

Toda siembra debe adaptarse a los siguientes principios generales:

- Practicarla en medios de cultivo favorable y previamente esterilizado.
- Emplear instrumentos asépticos.
- No contaminar ni destruir el inóculo
- Depositarla asépticamente en los medios elegidos
- Esterilizar los instrumentos empleados antes y después de cada operación<sup>18</sup>.

## **c). Dispensación de los discos:**

- Se debe colocar los discos con los dispensadores o manualmente con pinzas estériles. Debe asegurarse que contacten perfectamente con la superficie del agar, por lo que deben presionarse ligeramente sobre la superficie del agar.
- No deben situarse a menos de 15 mm del borde de la placa, y han de estar distribuidos de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición<sup>18</sup>.

**d). Lectura de los resultados:**

- Después de 18 horas de incubación leer el diámetro de las zonas de completa inhibición con un pie de rey o regla milimetrada.
- Si el microorganismo es un *Staphylococcus* y *enterococcus* debemos esperar 24 horas para asegurar la sensibilidad antibacteriana.
- Las zonas de los medios transparentes se miden sobre el reverso de la placa y los medios que contienen sangre sobre la superficie del agar.
- En las pruebas de sensibilidad antibacteriana en estafilococos el halo alrededor del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* "Tangelo" debe observarse utilizando luz transmitida para visualizar las colonias diminutas.
- Cuando aparecen colonias dentro del halo de inhibición, puede tratarse de mutantes resistentes, contaminaciones, poblaciones heterogéneas o cultivos mixtos y conviene volver a identificarlas y realizar otra vez el ensayo de sensibilidad antibacteriana.<sup>18</sup>
- Como regla general, no debe considerarse aquellas colonias diminutas que aparecen en el halo de inhibición y que han sido visualizadas mediante luz transmitida o con ayuda de una lupa.<sup>18</sup>

**e). Control de calidad:**

- Es necesario emplear cepas control para supervisar la exactitud y fiabilidad de la metodología, debido también al



gran número de variables que pueden afectar los resultados y que se han descrito anteriormente.

- Las cepas que se utilizan para el control de calidad son las mismas cepas de *Staphylococcus aureus*, se han establecido unos límites en los diámetros de las zonas de inhibición que son aceptables para las cepas utilizadas en el control de calidad. Los problemas que podamos encontrar en la determinación del halo de inhibición de las cepas de control de calidad.<sup>18</sup>
- Las cepas de control se mantienen en el congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  en alguno de los medios descritos para la conservación de cepas, con el fin de preservar su viabilidad y minimizar posibles modificaciones.
- Para resembrarlas debe utilizarse un escobillón o asa con el que se rasará la superficie del material congelado (no hace falta descongelar) y sembrar en una placa de agar sangre.
- Incubar a  $35^{\circ}\text{C}$ , de 18 a 20 horas, realizar una nueva resiembra que ya podrá emplearse para el ensayo. Debe realizarse controles cada nuevo lote de medio de cultivo y cada nuevo lote de antibióticos.<sup>18</sup>

### **2.2.3. Agar Müller-Hinton.**

Es el agar más empleado en estudios in vitro de los muchos medios disponibles, se considera el Agar Müller - Hinton como el mejor para pruebas de susceptibilidad de rutina de bacterias por las siguientes razones: <sup>19</sup>

- Reproducibilidad aceptable lote a lote para ensayos de susceptibilidad.
- Es bajo en inhibidores de sulfonamida, trimetoprim, y tetraciclina.

- Crecimiento satisfactorio para la mayoría de los patógenos no fastidiosos.
- Aunque el agar Müller - Hinton es confiable generalmente para prueba de susceptibilidad, los resultados obtenidos con algunos lotes, en ocasiones, varían significativamente.
- Si el lote del medio no soporta un adecuado crecimiento de organismos de prueba, las zonas obtenidas en un disco de difusión
- Usualmente son más grandes que lo esperado y pueden exceder los límites de control de calidad aceptable.
- Sólo las formulaciones del medio Müller - Hinton que han sido controladas con la cepa de referencia.<sup>19</sup>

#### **2.2.3.1. Preparación del Agar Müller Hinton:**

El agar Müller - Hinton debe ser preparado a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Inmediatamente después de auto clavar dejar enfriar en un baño de agua a 45- 50°C. Luego verter el preparado fresco y tibio a una placa Petri de vidrio o plástica, de fondo plano en un nivel, superficie horizontal para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm. Esto corresponde a 60 - 70 ml de medio por placa de diámetro de 150 mm y 25- 30 ml para placas de 100 mm de diámetro.<sup>19</sup>

El medio de agar debe dejarse que enfríe a temperatura ambiente, y a menos que la placa se use el mismo día, debe guardarse en refrigerador (2 - 8° C).

Las placas deberían usarse en un lapso de 7 días después de la preparación.<sup>19</sup>

### 2.2.3.2 El pH del Agar Müller-Hinton:

- El pH de cada lote de agar Müller-Hinton debería ser chequeado cuando el medio es preparado.
- El agar debe tener un pH entre 7,2 y 7,4 después de gelificar a temperatura ambiente.
- Si el pH es muy bajo, ciertas drogas parecería que pierden potencia (por ej. amino glucósidos, quinolonas y macrólidos), mientras otros agentes pueden presentar excesiva actividad (por ej. tetraciclinas).
- Si el pH es muy alto, puede esperarse efectos opuestos. El pH puede ser controlado por ejemplo macerando una cantidad suficiente de agar para sumergir la punta del electrodo.<sup>19</sup>

### 2.2.3.3 Humedad en el Agar Müller Hinton:

Un exceso de humedad justo antes del uso se presenta en la superficie del agar, las placas deberían ponerse en una incubadora (35°C) o una cámara de flujo laminar con las placas entreabiertas hasta que el exceso de humedad se haya perdido por evaporación (usualmente 10 a 30 minutos). La superficie debe ser húmeda, pero sin gotas de humedad en la superficie del medio o en la tapa de laca antes de ser inoculada.<sup>19</sup>

### 2.2.4 *Staphylococcus aureus* in vitro:

*Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram-positiva comensal que es considerada como una grave amenaza para los sistemas sanitarios modernos.

- Responsables de inflamación y supuración.
- Son bacterias no móviles.
- No esporuladas.
- No poseen cápsula.
- Son anaerobias facultativas.
- Producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre).<sup>20</sup>

#### **2.2.4.1 Descripción de Género y Especie:**

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas.<sup>20</sup>

El género *Staphylococcus* contiene 32 especies, de las cuales 16 de ellas se localizan en los humanos, algunas forman parte de la microbiota de piel y mucosas en humanos, y otras se encuentran sólo entre la flora de otros mamíferos.

#### **2.2.4.2 Factores de Virulencia:**

Entre las especies que colonizan al humano, las de mayor importancia clínica son: *S. aureus* y *Staphylococcus lugdunensis*, *epidermidis* y el *saprophyticus* son comúnmente responsables de infecciones relacionadas con dispositivos e infecciones del tracto urinario, siendo éstos menos infecciosos que *Staphylococcus aureus*.<sup>20</sup>

#### **2.2.4.3 Medios de Aislamiento:**

En los medios de cultivo tradicionales la mayoría de las especies crecen después de incubarse durante 18-24 horas, formando colonias de 0.5-1.5 mm de diámetro. Las colonias de *Staphylococcus aureus* se observan lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, presentan consistencia cremosa y pigmentación que va del amarillo a dorado debido a la producción de carotenoides, la mayoría de las cepas producen  $\beta$ -hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias cuando se cultivan en el agar y *Staphylococcus aureus* se diferencia de las demás especies por producir coagulasa que se manifiesta por su capacidad para coagular el plasma, es resistente al calor, a la desecación y puede crecer en medios con grandes cantidades de cloruro de sodio (7.5%).<sup>21</sup>

#### **2.2.4.4 Adquisición de *Staphylococcus aureus*:**

Las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* se producen por lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas que favorecen la penetración de la bacteria desde la piel a los tejidos profundos. Las infecciones por *Staphylococcus aureus* son supurativas y tienden a producir abscesos. Debido a su amplia versatilidad, esta bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro como infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y el síndrome de choque tóxico, así como infecciones gastrointestinales.<sup>21</sup>

#### **2.2.4.5 Identificación de *Staphylococcus aureus*:**

La identificación de rutina de *Staphylococcus aureus* está basada en el crecimiento en varios medios de cultivo, morfología colonial, características bioquímicas.

Su metabolismo es oxidativo/fermentativo, es catalasa-positivo y puede metabolizar una gran variedad de carbohidratos en condiciones aeróbicas.

Las tres condiciones necesarias para su óptimo desarrollo son: pH cercano a la neutralidad, temperatura alrededor de 30°C y ausencia de microorganismos competitivos. <sup>22</sup>

- Se puede encontrar en:
- Medio ambiente como puede ser: aire, polvo, superficies en donde se manejan alimentos, agua, agua residual.
- En alimentos: por ejemplo los que presentan un alto contenido proteico, como puede ser la leche y derivados lácteos, también se desarrolla en aquellos alimentos que presentan altas concentraciones de sal, uno de ellos sería el jamón; otro factor importante en los alimentos es el pH, así tenemos en el caso de la mayonesa, ésta tiene un pH lo suficientemente bajo para inhibir el desarrollo de *Staphylococcus aureus*.
- También se puede localizar en personas y animales. Estos últimos, los animales y las personas son los principales reservorios de estos microorganismos. <sup>22</sup>

#### **2.2.5 Aceite Esencial:**

El aceite esencial es una mezcla compleja de sustancias químicas que hacen parte del metabolismo de un vegetal compuesta por terpenos que están asociados o no a otras sustancias tales como

alcoholes, cetonas, resinas, ceras y pigmentos entre otros que en conjunto proporcionan a las esencias el olor que las caracteriza.

Los aceites esenciales se clasifican en base a diferentes criterios: según la consistencia de las esencias están divididas en fluidas, bálsamos y oleorresinas.<sup>23</sup>

Por su origen se clasifican como naturales, artificiales y sintéticas y de acuerdo con la naturaleza de sus componentes mayoritarios en aceites tipo monoterpenoides, sesquiterpenoides y compuestos oxigenados.

#### **2.2.5.1. Propiedades Fisicoquímicas de los Aceites Esenciales.**

- Son volátiles, líquidos a temperatura ambiente.
- Translúcidos y de color amarillo.
- Cuando se exponen al aire, se tornan espesos y se colorean intensamente.
- Poseen una densidad menor que el agua.
- Refractan la luz polarizada.
- Poseen un poder rotatorio característico debido a que en su composición existen numerosos productos ópticamente activos.
- Solubilidad alta en etanol.
- En algunos casos también son solubles en agua.
- Es ampliamente explotado en la elaboración de fragancias y soluciones hidroalcohólicas para la industria farmacéutica y cosmética.<sup>23</sup>

### a) Composición Química.

Los componentes son importantes ya que la composición, tanto cualitativa como cuantitativa, determina las características de los mismos y su potencial antibacteriano. El aceite esencial del *citrus paradisi* (“tangelo”) contienen del 85% a 99% de componentes volátiles y del 1% al 15% de componentes no volátiles.<sup>23</sup>

Componentes volátiles	Componentes no volátiles
- Limoneno	- Decanal
- Terpenos	- Cetonas
- Linalol	- Aldehídos
- Flavonoides	- Cumarinas

#### 2.2.5.2 Actividad antibacteriana de los aceites esenciales

La actividad antibacteriana de distintos aceites esenciales se ha evaluado en numerosas ocasiones, obteniendo resultados satisfactorios para la gran cantidad de vegetales y microorganismos. Dicha actividad va a depender de diversos factores como es la concentración, estructura química.

Algunos componentes con actividad antibacteriana son los flavonoides, terpenos, cumarinas y carotenos, además de alcoholes alifáticos. Aldehídos y acetonas, ácidos y isoflavonas., (Viuda-Martos et., 2008).<sup>24</sup>



### 2.2.5.3. Mecanismo de acción de los aceites esenciales

El mecanismo de acción como agentes antibacterianos no ha sido estudiado con gran detalle considerando el gran número de componentes químicos presentes en los aceites esenciales.

Además son altamente lipofílicos son capaces de disolverse en la membranas biológicas desarreglando estructuras y volviéndolas más permeables permitiendo la salida de iones y otros contenidos celulares. (Knobloch et al., 1986).<sup>25</sup>

Los aceites esenciales se relacionan con bajas concentraciones y con cambios en la estructura celular, lo que podría inhibir la respiración y alterar la permeabilidad de la membrana celular del microorganismo, mientras que altas concentraciones provocaría daños severos a la membrana y a la pérdida de homeostasis, dando lugar a la muerte celular. (Uribe et al., 1985).<sup>26</sup>

### 2.2.6. Vancomicina

#### 2.2.6.1 Historia

La vancomicina se obtuvo de *Streptomyces orientalis* en 1956, y en 1958 se introdujo en la práctica clínica como agente activo frente a SARM, desde la década de los 80 el consumo de la vancomicina ha ido aumentando, contribuyendo al aumento de bacterias resistentes a este antibiótico, especialmente *enterococcus* y *estafilococos*.<sup>27</sup>

Las infecciones causadas por bacterias Gram positivas resistentes a los Betalactámicos, especialmente los estafilococos meticilín-resistentes, han aumentado en las

últimas dos décadas y constituyen la causa más frecuente de infección nosocomial en muchos centros.

Las opciones para el tratamiento de dichas infecciones son escasas, y actualmente los glucopéptidos constituyen una terapia estándar para las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).

Los glucopéptidos son bactericidas sobre bacterias en fase de división, excepto sobre *enterococcus* y cepas de estafilococos tolerantes, en los cuales su efecto sería bacteriostático. Fundamentalmente inhiben la síntesis de la pared celular interfiriendo la producción de peptidoglucano, tienen un efecto después del antibiótico de corta duración, aproximadamente 2 horas.<sup>27</sup>

#### **2.2.6.2 Farmacocinética**

- No se absorben bien por vía oral.
- Se deben de administrar vía parenteral.
- Eliminación casi exclusiva glomerular.
- Alcanza concentraciones terapéuticas en:
- Penetración en hueso sólo del 15% al 20%, penetración en LCR es irregular; aunque en las meningitis puede alcanzar concentraciones que superan la CMI, se recomienda la administración por vía interventricular si no hay respuesta favorable tras la administración intravenosa.<sup>28</sup>

### 2.2.6.3. Mecanismo de Acción

- Efecto después del antibiótico de a próximamente 2 horas.
- Es bactericida.
- Inhibe la síntesis y ensamblaje de la pared bacteriana.
- Unión a péptido precursor previniendo la unión al peptidoglicano.
- Altera la permeabilidad de la membrana plasmática.
- Inhibe selectivamente la síntesis de ARN.<sup>28</sup>

### 2.2.6.4 Tratamiento

- Infecciones graves causadas por microorganismos Gram positivos resistentes a Beta-lactánticos.<sup>29</sup>
- Infecciones causadas por microorganismos Gram positivos en pacientes alérgicos a Beta-lactámicos.<sup>30</sup>
- Colitis pseudomembranosa que no responda a metronidazol o bien aquellas con una mala evolución que haga peligrar la vida del paciente.<sup>25</sup>

### 2.2.6.5. Identificación de variables

- **Variable independiente:** Aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("tangelo").
- **Variable dependiente:** Efecto antibacteriano.
- **Variable de control.**
- **Control positivo:** Vancomicina 500mg ampolla.
- **Control negativo:** Agua bidestilada.

### 2.3. Definición de Términos Básicos:

- **Aceite esencial:** Es una mezcla compleja de sustancias químicas que hacen parte del metabolismo de un vegetal compuesta por terpenos que están asociados o no a otras sustancias.<sup>22</sup>
- **Efecto antibacteriano:** Acción capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o su eliminación sin dañar el organismo infectado, como los antibióticos.<sup>16</sup>
- **Bacteria:** Son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$ , por lo general) y diversas formas incluyendo esferas, barras y hélices. Las bacterias son procariotas y por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, etc.), no tienen núcleo ni orgánulos internos.<sup>16</sup>
- **Disco difusor:** unas pequeñas cápsulas que contienen antibiótico, que liberan al medio. Se colocan en placas, estas se incuban y pasado el tiempo pertinente (varía según la especie de bacteria) se observa. Las bacterias habrán crecido por toda la placa salvo en las zonas impregnadas con el antibiótico.<sup>17</sup>
- **Cultivo:** Es la forma en la que se hacen crecer los microorganismos (colonias) en una superficie sólida (agar) o en medio líquido (caldo) e incluso en células (línea celular) y es utilizado como el método principal para poder estudiar a los agentes causales de enfermedades, y saber si se trata de bacterias, hongos, virus, parásitos o algas.<sup>17</sup>

- **Fito terapéuticos:** Es el producto medicinal empacado y etiquetado, cuyas sustancias activas provienen de material de la planta medicinal o asociaciones de estas, presentado en estado bruto o en forma farmacéutica que se utiliza con fines terapéuticos. También puede provenir de extractos, tinturas o aceites.<sup>22</sup>
- ***Staphylococcus aureus*:** Es una bacteria Gram-positiva comensal que es considerada como una grave amenaza para los sistemas sanitarios modernos.<sup>20</sup>
- **Tangelo (*Citrus paradisi*):** Es una especie de cítrico. Puede ser un híbrido entre mandarina y toronja.<sup>9</sup>
- **Antibiótico:** Agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de los microorganismos.<sup>16</sup>
- **Cepa:** Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.<sup>20</sup>
- **Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):** Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 – 24 horas de incubación.<sup>17</sup>
- **Bioseguridad:** Conjunto de medidas preventivas para proteger la salud y la seguridad humana y del ambiente, frente a diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, físicos, químicos o mecánico.<sup>17</sup>
- **Escala de Mc. Farland:** Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5.<sup>23</sup>

## 2.4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DIMENSIÓN	NIVEL DE MEDICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADOR	CATEGORÍA DE ESCALA	INSTRUMENTO
<p><b>V. INDEPENDIENTE</b></p> <p>Efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo") in vitro.</p>	<p>Porcentaje de concentración del aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo")</p>	<p>Cuantitativa</p>	<p>Ordinal</p>	<p>Porcentajes del aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("tangelo").</p>	<p>25% 50% 75 %</p>	<p>Guía de campo</p>
<p><b>V. DEPENDIENTE</b></p> <p>Inhibición de crecimiento de cepas del <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Halo de inhibición en el cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Cuantitativa</p>	<p>Ordinal</p>	<p>Medición del halo de inhibición en milímetros.</p>	<p>mm</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Regla milimetrada.</li> <li>- Pie de rey.</li> </ul>

## **CAPITULO III:**

### **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1 Tipo de Investigación:**

La investigación es de tipo:

**-Experimental:** Porque se va a valorar el efecto de una o más variables, donde el investigador manipula las condiciones de la investigación. (Hernández S. 2010).<sup>31</sup>

**-Transversal:** porque recolecta datos en un solo momento, en un tiempo único se describe variables y analiza su incidencia e interrelación en un momento dado. (Hernández S. 2010).<sup>31</sup>

**-Prospectivo:** porque los datos se analizan transcurrido un determinado tiempo en el futuro. (Hernández S. 2010).<sup>31</sup>

### **3.2. Nivel de Investigación**

**-Explicativo:** Porque explicamos el comportamiento de una variable en función a la otra, por ser estudio causa y efecto requieren control.

### **3.3. Diseño de la Investigación**

- La investigación corresponde a un diseño experimental in vitro.

### **3.4. Población y Muestreo de la Investigación.**

#### **3.4.1 Población**

- La cantidad utilizada del fruto *Citrus paradisi* ("Tangelo") fue de 36 kilos para la obtención del aceite esencial.

#### **3.4.2. Muestra.**

- La cantidad utilizada fue de 7.6 kilogramos de cáscara (flavedo) del *Citrus paradisi* ("Tangelo").

#### **3.4.3. Criterios de inclusión:**

- Cepas identificadas de *Staphylococcus aureus*.
- Cepas de *Staphylococcus aureus*, reactivadas.



#### **3.4.4. Criterios de exclusión:**

- Cepas no identificadas de *Staphylococcus aureus*.
- Cepas de *Staphylococcus aureus*, no reactivadas.

### **3.5. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos**

#### **3.5.1. Técnicas:**

**3.5.1.1 Guía de campo:** Instrumento donde registramos las bacterias que aparecen después del cultivo, así como todos los datos obtenidos después de realizar el experimento, por cada muestra, en los tiempos. (Ver anexo N°6).

**3.5.1.2 Observación directa:** para sembrar en placas Petri estériles y a su vez hacer la medición del halo de inhibición sobre el *Staphylococcus aureus*.

#### **3.5.2. Instrumentos:**

##### **3.5.2.1. Pie de rey**

Los halos de inhibición se medirán con el pie de rey, es un medidor de longitud el cual dispone de dos puntas para el control de las mediciones interiores y exteriores.

##### **3.5.2.2. Regla milimetrada estándar**

Es una regla de precisión fabricada en acero inoxidable con graduación de 0,5 mm desde 0 mm hasta una longitud máxima de 150 mm.

### **3.6. Materiales y equipos**

#### **3.6.1. Materiales:**

- Aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* (“tangelo”).
- Agar Müller Hinton.
- Agua bidestilada.
- Vancomicina 500mg ampolla.

#### **3.6.2. Equipos:**

- Instrumentos para la obtención del aceite esencial del *Citrus paradisi* (“tangelo”).
- Balanza de precisión.
- Instrumentos para la siembra microbiológica.
- Hisopos estériles.
- Placas Petri.
- Mechero de vidrio.
- Estufa de incubación.
- Varillas de vidrio.
- Papel kraft.
- Jeringas 10ml
- Agujas hipodérmicas.
- Mascarilla, gorro, guantes.

### 3.7. Métodos y Recolección de Datos

Los métodos aplicados en el presente trabajo de investigación fueron los siguientes:

- **Descriptivo:** Porque se describieron cada uno de los hechos presentados durante el uso del *Citrus paradisi* (“Tangelo”) en la inhibición del *Staphylococcus aureus* in vitro.<sup>31</sup>
- **Analítico:** Para establecer la relación las variables después del recojo de datos.<sup>31</sup>
- **Síntesis:** De tal manera que se formularon las conclusiones a las que se arribe el producto de la investigación.<sup>31</sup>
- **Estadístico:** Para procesar, analizar y presentar los datos recogidos de la muestra en estudio.<sup>31</sup>

### 3.8. Procedimiento

#### 3.8.1. Obtención del Aceite Esencial

Se recolectó el fruto *Citrus paradisi* (“tangelo”) proveniente del fundo “Santa Elena” del valle de Irrigación Santa Rosa del distrito de Sayán del departamento de Lima.

Por principio se tomó una muestra de 5 frutos incluido tallo y hojas del *Citrus paradisi* (“tangelo”), que fue llevada al Museo de Historia Natural de la Universidad Mayor de San

Marcos para su determinación botánica respectiva. **(ANEXO N°2).**

Una vez reconocida y determinada botánicamente como la planta de *Citrus paradisi* ("tangelo"), se llevó una muestra de 3 frutos de *Citrus paradisi* ("tangelo"), a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su Protocolo de Análisis (marcha fitoquímica). **(ANEXO N°3).**

### **3.8.2 Tratamiento de la Materia Prima**

- Antes de la extracción del aceite esencial de la cáscara del fruto se realizó los siguientes procesos:
- Se recolectó 36 kilos del fruto de *Citrus paradisi* ("tangelo"), seleccionando los mejores en color y tamaño.
- Lavado del fruto del *Citrus paradisi* ("tangelo").
- Se dejó secar por 2 horas.
- Pelado del fruto *Citrus paradisi* ("tangelo").
- Pesado de las cáscaras que se obtuvo 12 kilos.
- Picado de las cáscaras en trozos de tamaño aproximado de 3cm.
- Se preparó bolsas de papel kraft para poder llevar las cáscaras a la estufa.
- Después de 4 horas se procedió a retirar las cáscaras de la estufa y se dejó enfriar.
- Se obtuvo 7.6 kilogramos como muestra para el proceso de extracción del aceite esencial.

### **3.8.3. Extracción del Aceite Esencial del *Citrus paradisi*.**

Para este proceso se pesó la cáscara del tangelo que fue 7.6 Kg, se adaptó el equipo para utilizar en el proceso de destilación por arrastre de vapor que es una técnica utilizada para separar sustancias insolubles en agua y volátiles de otros no volátiles.

Se colocó en un recipiente, el material vegetal (cáscaras) sobre un falso fondo que impide el contacto con el medio líquido en ebullición a una temperatura de 100C<sup>o</sup>, produciendo el rompimiento del tejido vegetal (destilación de agua y vapor) liberando así aceite esencial después de un cierto tiempo, requiere de una presión baja y punto de ebullición alta, donde se obtuvo una suspensión acuosa de material vegetal (cáscara) en la peras de decantación se dejó en reposo por 24 horas<sup>21</sup>.

Después de este tiempo se realizó la separación de las fases y se obtuvo el aceite esencial la cantidad de 15 ml.

### **3.8.4. Lavado, Esterilización y Empacado del Material:**

Es necesario que todos los materiales estén en condiciones de esterilidad, limpiando primero toda el área de trabajo con una solución desinfectante.

El material a esterilizar se empacó, correctamente con papel kraft, siendo por sus características ideal para evitar el ingreso de microorganismos al interior y evita así la contaminación permeabilizando el material.

#### **3.8.4.1. Lavado**

- Enjabonamos el instrumental, mediante el detergente elegido para ablandar y disolver la suciedad.
- Se hizo fricción con un cepillo de cerdas no metálicas (las cerdas metálicas pueden dañar el acero) tiene por finalidad desprender la suciedad.
- Aclaremos con agua desmineralizada (las aguas duras pueden producir manchas en el material) el aclarado se realizará de forma minuciosa y con abundante agua, para arrastrar los restos orgánicos y del detergente.
- No existe una buena limpieza sin un aclarado perfecto ya que cualquier resto de detergente actuara como barrera, impidiendo la acción del agente esterilizante.

#### **3.8.4.2. Empacado:**

##### **Placas Petri:**

- Se cortó el papel kraft, en forma de rectángulos adecuados para la cantidad de 2 a 3 cajas. Colócalas en la parte central y envolverlas.
- Se tomó los extremos de Papel y se unieron.
- Se hizo un nuevo dobléz recargando ligeramente en la caja para marcarlo.
- Los extremos se doblaran en forma triangular.
- Ya en forma triangular se doblaran hacia atrás quedando listas.

### **Pipetas:**

- Se colocó una pequeña porción de algodón en el cuello de la pipeta.
- Procurando que quede lo suficientemente apretada.
- Con tiras de papel de 3 cm de ancho se envolvieron.
- Se comenzó por la punta y en forma de espiral giramos hacia arriba hasta el final de la pipeta.

### **3.8.4.3. Esterilización:**

- Se colocó el material dentro de la esterilizadora.
- Se encendió y se pusieron los instrumentos a la temperatura y posición correcta (121°C) a 10-20 PSI.
- Una vez alcanzado la temperatura correcta prolongamos 20 minutos de exposición.
- Se consideró el tiempo de exposición del equipo, dejamos un tiempo de enfriamiento.
- Se retiró los empaques y coloco en lugares adecuados hasta su uso.

### **3.8.5. Preparación del Agar Müller Hinton :**

- La preparación del agar Müller - Hinton se llevó a cabo en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, para asegurar los estándares de calidad del agar.
- La preparación estuvo a cargo de la microbióloga Dora Maurtua Torres.
- La cantidad del medio de cultivo preparado fue de 500gr, envasado en frascos de vidrio de 100gr cada uno.

- Los frascos fueron almacenados en un lugar oscuro, a una temperatura entre 2 y 8 C° (parte más baja de la refrigeradora) envueltas en bolsas de polietileno para que no pierdan su humedad hasta antes de usarlas.
- Evitar la congelación y el calentamiento excesivo, la fecha de duración del agar Müller - Hinton es de 1 semana.

#### **3.8.5.1. Disolución del Medio de Cultivo Líquido:**

- Se llevó a baño María 4 frascos de 100gr cada uno de agar Müller – Hinton, para su disolución del medio de cultivo líquido.
- Se vertió 10ml de agar Müller Hinton en cada placa (30 placas) cantidad necesaria para que la bacteria del *Staphylococcus aureus* pueda tener nutrientes necesario para su crecimiento.
- Una vez solidificado el agar de las 30 placas empecé con el sembrado del microorganismo.

#### **3.8.5.2. Disolución del Aceite Esencial:**

- Se realizó las disoluciones del aceite esencial del *Citrus paradisi* (“tangelo”), al 25%, 50% y 75%.
- Se preparó 5ml de disolución (aceite esencial-agua bidestilada) para cada concentración.
- Concentración al 25%: se utilizó 1.25ml de aceite esencial y 3.75 ml de agua para obtener 5ml de disolución.
- Concentración al 50%: se utilizó 2.5 ml de aceite esencial y 2.5 ml de agua para obtener 5ml de disolución.
- Concentración al 75%: se utilizó 3.75 ml de aceite esencial y 1.25 ml de agua para obtener 5ml de disolución.



#### **3.8.5.3. Procedimiento Microbiológico:**

- Las cepas bacteriológicas del *Staphylococcus aureus* fue reactivadas en el departamento de microbiología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- El cultivo de las cepas se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad Alas Peruanas – filial Huacho, por la investigadora, bajo la supervisión de la microbióloga Dora Maurtua Torres.
- Posteriormente se realizó el sembrado selectivo, mediante la técnica del hisopado sobre los medios de cultivo respectivos.

#### **3.8.5.4. Sembrado del Microorganismo:**

- Se enumeró cada placa con números arábigos del 1 al 30 en relación a la cantidad de placas a utilizar.
- Se hizo una marcación de 4 campos iguales en cada placa y en los bordes se marcó las concentraciones (25%,50% y 75%) del aceite esencial del *Citrus paradisi* (“tangelo”) y el fármaco utilizado como testigo, y en 30 placas por separado se utilizó el agua bidestilada (control negativo)
- Para el fármaco testigo (vancomicina 500mg amp.) también se preparó su disolución de 5ml.
- Para el control negativo (agua bidestilada) 5ml.
- Se esterilizó un asa de siembra por flameado en la llama de un mechero.
- Se introdujo en la suspensión bacteriana para recoger una muestra.

- Realicé el sembrado haciendo estrías sobre la superficie de un medio sólido en una placa Petri.
- Se vuelve a esterilizar el asa de siembra, cada vez que se cambie de placa hasta terminar con la totalidad de 30 placas.
- Realicé la hidratación de 30 monodiscos de cada concentración del aceite esencial del *Citrus paradisi* ("tangelo") al 25%, 50% y 75% y 30 monodiscos del fármaco testigo (Vancomicina ampolla de 500mg), y el control negativo (agua bidestilada), que es uno de los medicamentos utilizados contra *Staphylococcus aureus* impregnado como un (antibacteriano).
- Coloqué los monodiscos a una distancia de 20 mm de distancia entre monodiscos.
- Después de terminar con el sembrado se procede a envolver con el papel kraft y enumerar cada placa del 1 al 30 y colocar la fecha respectiva.
- Se llevó a la incubadora a una temperatura 37C° en ausencia de oxígeno (idóneo para el crecimiento de los microorganismos).

#### **3.8.5.5. Control de Calidad del *Staphylococcus aureus*:**

- Seleccioné aquellas cepas de referencia, en cuanto a género y especie, que más se asemejen a los aislamientos bacterianos en el laboratorio.
- Verificación del resultado del antibiograma.
- Revisión de resultados por parte del microbiólogo.
- Seleccioné las cepas de referencia que tienen rangos definidos para los halos de inhibición.

- Se debe tener en consideración que los rangos de los halos de inhibición para el control de calidad definidos por el Clínical and Laboratory Standards Institute (CLSI), son válidos sólo cuando se realiza el método de susceptibilidad.
- Las cepas eran de buena calidad comprobándose en el laboratorio de la Universidad Alas Peruanas-Filial Huacho, y habiéndose realizado su adquisición de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.(**ANEXO N° 07**)

#### **3.8.5.6. Medición de los Halos:**

- El microorganismo creció en la superficie de la placa, pero alrededor de los disco se formaron unos halos de inhibición más o menos grandes, dependiendo de la mayor o menos sensibilidad de la bacteria a cada concentración.
- Se midió el diámetro de los halos de inhibición con el calibrador vernier (pie de rey) debidamente milimetrado en la base de la placa, el crecimiento alrededor de las placas fueron medianos y grandes se registraron en la ficha de recolección de datos. **ANEXO (06).**
- La medición de los halos de inhibición lo realicé a las 24 horas y 48 horas.
- La correlación diámetro/concentración mínima inhibitoria no se efectúa en términos cuantitativos, porque la técnica no es lo suficientemente exacta como para permitir cuantificar con precisión.

### 3.8.6. Procesamiento de Datos

- Para interpretar los resultados del estudio de acuerdo a los objetivos e hipótesis, se midió y se compararon los halos de inhibición entre los grupos de las concentraciones del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("tangelo") el fármaco Vancomicina 500mg ampolla (control positivo), agua bidestilada (control negativo).
- El análisis se realizó con Software SPSS V21.
- Entre el grupo de estudio de las concentraciones (25%,50% y 75% del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("tangelo") y el control positivo (Vancomicina ampolla 500mg), control negativo (agua bidestilada), a fin de evaluar las diferencia significativas que pueda existir en relación al promedio del diámetro de inhibición.

## **CAPITULO IV:**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.1 Resultados.**

De acuerdo a lo reportado en este trabajo de investigación, cuyo objetivo fue determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("Tangelo"), sobre cultivos de la bacteria *Staphylococcus aureus* in vitro a través del método de antibiograma de Kirby Bauer (dilución en agar Müller Hinton), se utilizó 30 placas donde podemos demostrar las medidas de los halos de inhibición antibacteriana a las 48 horas.

## 4.2 Análisis e Interpretación de Resultados

**Tabla1.** Lectura de placa en 48 horas

Medición de halos en los cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i> a las 48 horas.					
PLACAS	25%/mm	50%mm	75%mm	VANCOMICINA 500mg/mm	Agua bidestilada
1	1.1	1.9	1.2	10.1	0
2	3.2	0.7	0.5	9.3	0
3	0.8	1.5	0.6	9.7	0
4	1.0	2.3	0.4	6.3	0
5	0.7	0.5	0.6	8.5	0
6	2.7	3.4	1.6	9	0
7	1.9	0.3	1.6	6.5	0
8	0.4	0.3	0.7	0.2	0
9	1.9	0.7	1.7	11.4	0
10	3	1.8	0.9	8.4	0
11	2.5	0.5	0.2	9	0
12	2.5	1.1	0.6	5.6	0
13	1	1.9	4.8	8.9	0
14	3	1.5	1.8	9.6	0
15	2.6	1.9	0.9	9.7	0
16	2.9	1.8	1.8	10	0
17	2.3	1	0.8	9.8	0
18	1.9	1.7	0.9	7	0
19	2	0.6	1.5	8.8	0
20	1.5	1.1	0.1	12.7	0
21	2.1	0.9	2.1	9.9	0
22	1.1	1.3	0.8	3.5	0
23	3.2	1.7	0.6	8.8	0
24	1.9	7.8	0.6	12.7	0
25	1.8	1	2.6	8.8	0
26	1.4	1.2	0.5	8.2	0
27	1	1.1	1.2	6.6	0
28	1.5	1.9	3.8	11.6	0
29	1.8	1.2	1.3	15	0
30	0.7	1.7	1.5	4.6	0

**Tabla 2.** Concentraciones del aceite esencial de *Citrus paradisi*.

Datos estadístico	25%	50%	75%	Vancomicina
Media	1.8	1.4	1.2	8.3
varianza	0.8	2.0	1.2	12.6
Desv.Estandar	0.9	1.4	1.1	3.6
Coef.Variacion	0.5	1.0	0.9	0.4
X min	0.1	0.1	0	0
Cuartil 1	-	-	-	-
Cuartil 2	-	-	-	-
Mediana	1.9	1.2	0.9	9.0
X máx.	3.2	7.8	4.8	15
moda	1.9	1.9	0.6	8.8

Software SPSS V21

**Tabla 3.** Rango promedio

Variables	25%	50%	75%	Vancomicina
Media	1.8	1.4	1.2	8.3

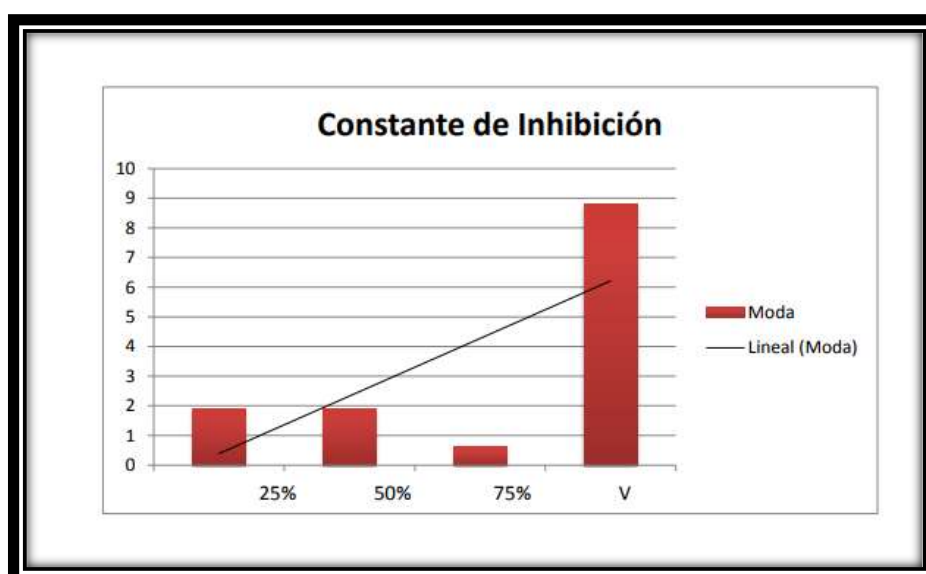
Software SPSS V21

**Gráfico N°1.** Rango promedio de los halos de las concentraciones de aceite esencial del fruto de *Citrus paradisi* ("Tangelo").



**Software SPSS V21**

**Gráfico N°2.** Actividad inhibitoria in vitro sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, según la concentración del aceite esencial del *Citrus paradisi*.



**Software SPSS V21**



## **CAPITULO V:**

### **DISCUSIÓN**

En la presente investigación se buscó determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* (“tangelo”) in vitro frente a la bacteria de *Staphylococcus aureus*, utilizando concentraciones de 25%,50% y 75% lo cual ha quedado demostrado que existe un efecto de inhibición del desarrollo bacteriano con el aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* (“tangelo”), al 25% de concentración presenta mayor efecto antibacteriano, y en las concentraciones de 50% y 75% va disminuyendo el efecto antibacteriano debido a la volatilidad que presenta los aceites esenciales, se podría asumir a los flavonoides como la sustancia responsable de la actividad antibacteriana, también cabe señalar que es extremadamente difícil correlacionar a un único compuesto debido a que los componentes pueden actuar sinérgicamente en el cultivo de la bacteria de *Staphylococcus aureus*.

Según los resultados obtenidos; además se encontró diferencias significativas con respecto al tamaño del halo de inhibición en las distintas concentraciones utilizadas.

**Tabla N°1,** Se ilustra los resultados de la medición de los halos de inhibición de la bacteria de *Staphylococcus aureus* en las concentraciones del 25%, 50% y 75% del aceite esencial del *Citrus paradisi* (“tangelo”), y además estos resultados hacen referencia similar al estudio del autor Mercado, M., (2014)<sup>2</sup> quien realizó el tema “Sensibilidad de *pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a concentración de aceite de *Citrus reticulata* variedad satsuma “mandarina”. Quien demostró que las bacterias son sensibles al aceite esencial de *C.reticulata* variedad satsuma “mandarina”. Es casi el 80% similar a mis resultados.

**Tabla N°2,** Se observa los resultados estadísticos obtenidos mediante el Software SPSS V21, del cual obtenemos los datos que nos indica cada valor obtenido de la lectura de los halos de inhibición a las 48 horas además estos resultados hacen referencia similar al estudio del autor Vargas, D., (2015)<sup>3</sup>, con su tema “Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus sinensis* contra *Listeria monocytogenes*”. Quien demostró el efecto antibacteriano en relación a sus concentraciones. Es casi el 60% similar a mis resultados.

**Gráfico N°1,** Se ilustra las medias de los halos de inhibición expuestas y agrupadas en las tres distintas concentraciones del aceite esencial del *Citrus paradisi* (“tangelo”), se observa que las medias promedio de los halos de inhibición formados para las concentraciones del 25%, 50% Y 75% muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

**Gráfico N°2,** Se evidencia la actividad inhibitoria in vitro sobre las bacterias de *Staphylococcus aureus*, según las concentraciones del aceite esencial del fruto del *Citrus paradisi* (“tangelo”). En la que se identifica la actividad antibacteriana de tipo sensible en las concentraciones de 25%, 50% y 75%, los resultados demuestran que existen diferencias significativas con respecto a los halos de inhibición

formados en las diferentes concentraciones del aceite esencial del *Citrus paradisi* (“tangelo”).

Con el presente estudio se determinó el efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto del *Citrus paradisi* (“tangelo”) sobre cultivos de bacterias de *Staphylococcus aureus* presentando halos de inhibición de mayor diámetro en la concentración del 25%, mientras que los halos de menor diámetro fueron de las concentraciones de 50% y 75%.

- En el año 2014, Mercado, M., El objetivo fue determinar la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a diferentes concentraciones del aceite de *Citrus reticulata*, variedad Satsuma “mandarina”. El aceite se obtuvo por el método de destilación por arrastre con vapor de agua, a partir del flavedo de la mandarina, utilizó el método de difusión en agar en concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100% de aceite. se encontró mayor sensibilidad en las concentraciones de 60%, y 80%. El autor concluyó que las bacterias en estudio son sensibles al aceite esencial de *C. reticulata* variedad Satsuma “mandarina.”<sup>2</sup>

Este estudio tiene relación con la presente investigación en cuanto al método de obtención del aceite esencial, la bacteria utilizada *Staphylococcus aureus* si bien es cierto no es la misma planta pero pertenecen a la misma familia de las *Rutaceae*, además no existen trabajos previos de índole antibacteriana con respecto al *Citrus paradisi* (“tangelo”).

- En el año 2016, Saldarriaga, A., El objetivo fue la Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial de *Citrus sinensis* (Naranja) variedad Tangelo en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*.

Se relaciona con la presente investigación en cuanto a la obtención del aceite esencial el cual se obtuvo por destilación de arrastre con vapor de agua a partir del flavedo de la naranja, el cual concuerda con mi estudio demostrando el efecto antibacteriano, la cual únicamente se estudió el efecto inhibitorio frente a cultivos de *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones.

## **CAPITULO VI:**

### **CONCLUSIONES**

- El aceite esencial del fruto de *Citrus paradisi* ("tangelo") presenta efecto antibacteriano in vitro frente a *Staphylococcus aureus*.
  
- El efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto de *Citrus paradisi* ("tangelo") al 25% tiene mayor efecto antibacteriano con una media de 1.8 mm de diámetro, por lo que se concluye que es efectivo usar sobre el cultivo de la bacteria *Staphylococcus aureus* in vitro.
  
- El efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto de *Citrus paradisi* ("tangelo") al 50% tiene efecto antibacteriano pero va en disminución con una media de 1.4 mm de diámetro, por lo que se concluye que es efectivo usar sobre cultivo de la bacteria *Staphylococcus aureus* in vitro.

- El efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto de *Citrus paradisi* ("tangelo"), al 75% tiene un menor efecto antibacteriano con una media de 1.2 mm de diámetro, por lo que se concluye que es menos eficaz usar sobre cultivo de la bacteria *Staphylococcus aureus* in vitro.

## **CAPITULO VII:**

### **RECOMENDACIONES**

- Se sugiere investigaciones con el aceite esencial del *Citrus paradisi* (“tangelo”), en concentraciones menores a 25% en comparación con la Vancomicina 500mg como control positivo.
- Ampliar la investigación hacia formulaciones de ungüento que contengan el aceite esencial del *citrus paradisi* (“tangelo”).
- Se sugiere hacer trabajos de investigación para evaluar el efecto de *citrus paradisi* (“tangelo”), en otra bacterias que estén relacionadas con las diferentes patologías del ser humano.

- Realizar investigaciones del *citrus paradisi* (“tangelo”), con otras propiedades como infecciones urinarias, respiratorias, cardiovasculares etc.
- Se sugiere hacer trabajos de investigación para evaluar otras propiedades que podría tener la planta del *Citrus paradisi* (“tangelo”) con otras bacterias causantes de patologías.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Teixeira, L., Evallacao do uso de Extracto de Alecrim de Jardim (*Rosmarinus Officinalis* linn) no controle do biofilme de *Staphylococcus aureus*. [ Internet] 2012 [acceso el 05 julio del 2017] Disponible en: [www.odontologia.ufpr.br/bancotcc/CD.../Lucimari%20Teixeira.p](http://www.odontologia.ufpr.br/bancotcc/CD.../Lucimari%20Teixeira.p).
2. Mercado M., Sensibilidad de *pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a concentración de aceite de citrus reticulata variedad satsuma “mandarina. [ Internet] 2014 [acceso el 21 julio del 2017] Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe:8080/xmlui/bitstream/handle/UNITRU/2637/Trujillo%20Laguna,%20Mar%C3%ADa%20Victoria.pdf.pdf?sequence=1>.
3. Saldarriaga, A., “Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial de *Citrus sinensis* (Naranja) variedad Tangelo en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*.” [Internet] 2016. [acceso 05 Octubre del 2017 ] .Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/873>.
4. Vargas, D., “Efecto del aceite esencial de *Citrus sinensis* contra *Listeria monocytogenes* [Internet] 2016. [acceso 05 Octubre del 2017 ] .Disponible en: <http://www.dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/.../Vargas%20Rivers%20Diana%20Carla.pdf?>.

5. Da Silva, A., Determinación de la actividad antibacteriana de tres variedades de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck, *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación con *Citrus reticulata* y *Citrus medica* L.) Frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. [Internet] 2015 [acceso el 25 julio del 2017] . Disponible en:  
[http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S8888-88882015000100006&script=sci\\_arttext](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S8888-88882015000100006&script=sci_arttext).
  
6. Macías, SW. Proceso de Obtención de Extracto a partir de la Semilla de la Toronja (*Citrus Paradisi*) y su Aplicación en Desinfección de Vegetales o Frutas y Superficies Planas.[ Internet] 2014 [acceso el 2 Agosto del 2017] Disponible en:  
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/7195/1/MACIAS.pdf>.
  
7. Coello, S. Evaluación del Rendimiento en la Determinación de aceite esencial y pectina de tres cítricos limón “Chino”, Mandarina “Criolla” y Toronja “Blanca.[ Internet] 2014 [acceso el 08 Agosto del 2017] Disponible en:  
<http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/262>.
  
8. Hallo, O. Estudio Físico-Químico y Cromatográfico comparativo del fruto de naranja variedades Valencia (*Citrus Sinensis*) y Tangelo (*Citrus Paradisi* x *Citrus Reticulada*) en dos estados de madurez proveniente del Cantón Las Naves. .[ Internet] 2013 [acceso el 10 Agosto del 2017] Disponible en:  
<http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/247/1/T-UTEQ-0004.pdf>.

9. Aristizabal, G, Evaluación de la actividad anti fúngica de los extractos de las cáscaras y semillas de tres especies de cítricos contra el hongo fito patógeno *Fusarium roseum*. [ Internet] 2011 [acceso el 10 Agosto del 2017] Disponible en :  
<http://hdl.handle.net/10554/8842>.
  
10. Escobar, B , Extracción de compuestos fenólicos de las Cáscaras de Cítricos Producidos en México. [ Internet] 2010 [acceso el 21 Agosto del 2017] Disponible en:  
<http://www.tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/9612/34.pdf?sequence=1>
  
11. Ficha técnica., Tangelo *Citrus paradisi* x *Citrus reticulata*. [ Internet] 2010 [acceso el 21 Agosto del 2017] Disponible en:  
<http://www.sabelotodo.org/agricultura/frutales/tangelo.html>.
  
12. Orduz, R., Generalidades de los cítricos y recomendaciones agronómicas para su cultivo en Colombia. [Internet] 2010 [ acceso 24 Mayo del 2017] Disponible en:  
<http://www.repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/561/1/CAPITULO%202.pdf>
  
13. Domínguez, T., Cuantificación de Flavonoides de la cascara de naranja y tangelo. [Internet] 2016 [acceso 24 Mayo del 2017] Disponible en:  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2077-99172016000500007](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172016000500007).

14. Martínez F. Revisión Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes S. Departamento de Fisiología, Universidad de León y \*Hospital de León. España. [Internet] 2014 [ acceso 24 Mayo del 2017] Disponible en:

<https://www.unileon.es/estudiantes/estudiantes-grado/oferta-de-estudios/planes?>

15. Ingram, J., Tangelo y taxonomía [Internet] 2012 [ acceso 29 Mayo del 2017] Disponible en:

<http://www.ecured.cu/Tangelo#Taxonom.C3.ADa>.

16. Diccionario de Farmacia Antibacteriano: Definición Antibacteriano-Doctísimo. [Internet] 2017 [acceso 29 Mayo del 2017] Disponible en:

<http://www.doctissimo.com/es/salud/diccionario-medico/antibacteriano>.

17. ¿Qué es un antibacteriano?- su definición, concepto y significado. [Internet] 2015 [ acceso 29 Mayo del 2017] Disponible en:

<http://www.conceptodefinicion.de/antibacteriano/>.

18. Clavell, P., Antiograma—Universidad Central de Venezuela. Determinación de la Sensibilidad de las Bacterias a los Antibióticos (Antibiograma). . [Internet] 2011.[acceso 30 Abril del 2017] Disponible en:

[http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedra\\_Micro/10\\_Antibiograma.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedra_Micro/10_Antibiograma.pdf).

19. Prat M. Lab. Susceptibilidad Sección Bacteriología. Manual de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico, ISP. [Internet] 2014. [acceso 30 junio del 2017 ] .Disponible en:  
[http://www.ispch.cl/lab\\_sal/doc/manual\\_susceptibilidad.pdf](http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf).
  
20. Cervantes G., Características generales del *Staphylococcus aureus*. [Internet] 2014. [acceso 14 Mayo del 2017 ] .Disponible en:  
<http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
  
21. Jablonskin\_L., Método para la Determinación de *Staphylococcus aureus*. [Internet] 2013. [acceso 04 Mayo del 2017 ] .Disponible en:  
[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/patogNOMStaphylococcus\\_aureus\\_17365.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/patogNOMStaphylococcus_aureus_17365.pdf).
  
22. Block, S.: Disinfection, sterilization and preservation. Lea and Fibiger. Filadelfia. 1991. [Internet] 2013. [acceso 16 Julio del 2017 ] .Disponible en:  
[www.worldcat.org/.../disinfection-sterilization-and-preservation/...](http://www.worldcat.org/.../disinfection-sterilization-and-preservation/...)
  
23. Quispe, A., Extracción, Obtención Caracterización y estudio del aceite de naranja. [Internet] 2015. [acceso 30 Julio del 2017 ] .Disponible en:  
<https://www.scribd.com/document/257604642/Aceite-esencial>

24. Viuda-Martos et al Revisión bibliográfica.[internet] 2008 [acceso 10 de Enero 2018].Disponible en :  
[http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lia/velazquez\\_n\\_mj/capitulo4.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/velazquez_n_mj/capitulo4.pdf).
25. Knobloch et al, Revisión bibliográfica. [internet] 2008 [acceso 10 de Enero 2018].Disponible en :  
[http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lia/velazquez\\_n\\_mj/capitulo4.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/velazquez_n_mj/capitulo4.pdf).
26. Uribe et al., revisión bibliográfica. [internet] 2008 [acceso 10 de Enero 2018].Disponible en :  
[http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lia/velazquez\\_n\\_mj/capitulo4.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/velazquez_n_mj/capitulo4.pdf).
27. Sacsquispe, C., Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. [Internet] 2014. [acceso 30 junio del 2017 ] .Disponible en:  
[www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf](http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf)
28. Luear, M., Vancomycin administration into the cerebrospinal fluid [internet] 1993. [Acceso 15 Diciembre del 2017].  
Disponible en:  
[www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/v004.html](http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/v004.html).
29. Vallejos P., Escala de MC Farland. [Internet] 2012. [acceso 23 Abril del 2017 ] .Disponible en:  
[https://es.slideshare.net/ponysjsm/mc-farland-15704291\\_](https://es.slideshare.net/ponysjsm/mc-farland-15704291_)

30. Carrillo, A., Glucopeptidos. [Internet] 2010. [acceso 29 Setiembre del 2017 ] .Disponible en:  
[http://www.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/hinmaculada/web/servicios/mi/FICHEROS/docente/Glucopeptidos%20COPY%2097\\_03.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/hinmaculada/web/servicios/mi/FICHEROS/docente/Glucopeptidos%20COPY%2097_03.pdf).
31. Hernández Sampieri R. Et Al. Metodología de la investigación. 1991. Pp. 109, 173, 181.
32. Pérez, Farmacognosia y medicamentos herbarios [internet] 2014 [acceso 21 Enero del 2018]. Disponible en :  
<http://www.saber.ucv.ve/bitstream/123456789/7969/1/9.TERPENOS%202013-2014.pdf>.
33. Serra, S. Desarrollo de derivados de 4-hidroxycumarina con diferente actividad farmacológica [internet] 2014 [acceso 21 de Enero del 2018]. Disponible en:  
[http://www.sveprints.unica.it/689/1/PhD\\_Serra\\_Silvia.pdf](http://www.sveprints.unica.it/689/1/PhD_Serra_Silvia.pdf).
34. Meléndez, M.et, al. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas, Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Vol. 57 N° 2, 2007.  
<http://www.sanutricion.org.ar/files/upload/files/carotenoides.pdf>
35. Shashank, K. Química y actividad biológica de los flavonoides [acceso 16 de Enero del 2018]. Disponible en:  
<http://www.dx.doi.org/10.1155/2013/162750>

36. Morejón, M., *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina un problema actual[internet] 2012 [acceso 28 Enero del 2018]. Disponible en:  
[http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v22\\_n1/pdf/a05v22n1.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v22_n1/pdf/a05v22n1.pdf)



# ANEXOS

## ANEXO N°1

### Matriz de Consistencia

#### DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DEL FRUTO *Citrus paradisi* ("TANGELO") FRENTE A *Staphylococcus aureus* IN VITRO.

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÒTESIS	VARIABLES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICION	TECNICA Y MÈTODO	INSTRUMENTOS
<p><b>PROBLEMA GENERAL:</b></p> <p>¿Presentará efecto antibacteriano el aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo") frente a <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro?</p> <p><b>Problema Específicos:</b></p> <p>¿Presentará efecto antibacteriano el aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo") al 25% frente a <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro?</p> <p>¿Presentará efecto antibacteriano el aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo") al 50% frente a <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro?</p> <p>¿Presentará efecto antibacteriano el aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo"), al 75% frente a <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro.</p>	<p><b>OBJETIVO GENERAL:</b></p> <p>Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo") frente a <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro.</p> <p><b>Objetivos Específicos:</b></p> <p>Evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo") al 25% frente a <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro.</p> <p>Evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo") al 50% frente a <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro.</p> <p>Evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo") al 75% frente a <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro.</p>	<p><b>HIPÒTESIS GENERAL:</b></p> <p>El aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo") presenta un alto nivel de eficacia antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro.</p> <p><b>Hipòtesis Específica:</b></p> <p>El aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo") al 25%, de concentración, presenta eficacia antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro.</p> <p>El aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo") al 50%, de concentración, presenta eficacia antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro.</p> <p>El aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo") al 75%, de concentración, presenta eficacia antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro.</p>	<p><b>Variable Independiente:</b></p> <p>Aceite esencial del fruto <i>Citrus paradisi</i> ("Tangelo").</p> <p><b>Variable Dependiente:</b></p> <p>Efecto antibacteriano.</p>	<p>Aceite esencial del <i>Citrus paradisi</i> al 25%.</p> <p>Aceite esencial del <i>Citrus paradisi</i> al 50%.</p> <p>Aceite esencial del <i>Citrus paradisi</i> al 75%.</p> <p>Medición del halo de inhibición en milímetros</p>	<p>Ordinal.</p> <p>Ordinal.</p>	<p><b>TÈCNICA</b></p> <p><b>Nivel:</b></p> <p>Explicativo</p> <p><b>Tipo:</b> Aplicada.</p> <p><b>Diseño:</b></p> <p>Experimental</p> <p><b>METODO</b></p> <p>Observación directa</p> <p>Método Estadístico.</p>	<p>Guía de campo.</p> <p>Observación directa.</p> <p>Pie de rey.</p> <p>Regla milimetrada.</p>

## ANEXO N°02



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

### CONSTANCIA N° 132-USM-2017

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 (fruto) recibida de **Consuelo Elizabeth MANTILLA RODRIGUEZ**, ha sido estudiada y clasificada como: ***Citrus reticulata*** Blanco 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 reticulata* Blanco**

Nombre vulgar: "tangelo"  
Determinado por: Blgo. Mario Benavente Palacios.

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

Lima, 11 de julio de 2017

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



ACE/ddb

## ANEXO N° 03



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



### PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00223-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS : 004486/2017  
SOLICITADO POR : CONSUELO ELIZABETH MANTILLA RODRIGUEZ  
MUESTRA : TANGELO  
NÚMERO DE LOTE : —  
CANTIDAD : 3 frutos  
FECHA DE RECEPCIÓN : 14 de Julio del 2017

PRUEBAS	ESPECIFICACIONES	MÉTODOS	RESULTADOS
<b>MARCHA FITOQUÍMICA</b>			
ANTOCIANINAS	Reacción con Alcohol amílico	Cualitativo	-
	Reacción de Dragendorff	Cualitativo	+
ALCALOIDES	Reacción de Mayer	Cualitativo	-
	Reacción de Wagner	Cualitativo	-
LACTONAS	Reacción de Baljet	Cualitativo	-
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	Cualitativo	+
CARDENÓLIDOS	Reacción Kedde	Cualitativo	-
ESTEROIDES	Reacción de Lieberman - Burchard	Cualitativo	-
SAPONINAS	Reacción de espuma	Cualitativo	+
TANINOS	Reacción Cloruro férrico	Cualitativo	-
TRITERPENOS	Reacción de Lieberman - Burchard	Cualitativo	-
AZÚCARES REDUCTORES	Reacción Fehling	Cualitativo	+++
FENOLES	Reacción Cloruro férrico	Cualitativo	-

Lima, 17 de Julio del 2017

**Q.F. Nelson Bautista Cruz**  
Director del Centro de Control Analítico



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

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



## ANEXO Nº 04

**Solicito:** Permiso para el ingreso al Fondo "Santa Elena" Irrigación Santa Rosa-Sayán

Sr. Marcos Domínguez

Ing. Agrónomo- encargado del Fundo.

De nuestra mayor consideración:

Me dirijo a Ud. con el principal motivo de solicitarle tenga a bien, autorizar mi ingreso al Fundo para hacer seguimiento al proceso de desarrollo y cosecha del fruto TANGELO, el cual utilizare para mi proyecto de Investigación.

Dicho pedido se basa en un proyecto de investigación para realizar mi tesis y obtener mi título profesional.

Atentamente,



**Consuelo E. Mantilla Rodríguez**  
UAP Filial - Huacho

Huacho, Abril del 2017



RECIBIDO  
28/04/2017



## ANEXO N°06

Medición de los halos en los cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i> a las 48 horas			
N° de placa	75%	50%	25%
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

## ANEXO N° 07



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

### CONSTANCIA

La que suscribe hace constar que:

La bachiller: CONSUELO ELIZABETH Mantilla Rodríguez, adquirió cepas bacteriológicas de *Staphylococcus Aureus* 25923® del departamento de microbiología de la UPCH. Para desarrollar su proyecto de Investigación Tema: Determinación del efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto *Citrus Paradisi* "Tangelo" frente a *Staphylococcus Aureus* in vitro.

-Se expende la presente constancia para los fines convenientes.

S.M.P. Lima, 30 de agosto 2017

MSc. Maurtua Torres Dora  
Docente Microbiología - FCF - UPCH  
C.B.P. 776

D/UPCH  
Arthro

Av. Honorio Delgado 430, Urb. Ingeniería, S.M.P. Lima - Perú.  
Teléfono: (51-1) 310 - 0000 // email: portalweb@upch.pe



## ANEXO N° 08



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

### CONSTANCIA

La que suscribe hace constar que:

La bachiller

**CONSUELO ELIZABETH Mantilla Rodríguez**

A cumplido con los protocolos establecidos bajo la normas de bioseguridad en la manipular de microorganismos, bajo la supervisión de quien suscribe.

Todo ello para llevar a cabo su proyecto de tesis titulado:

“DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESNCIAL DEL FRUTO CITRUS PARADISI **-TANGELO-** FRENTE A STAPHYLOCOCCUS AERUS IN VITRO.

-Se expende la presente constancia para los fines convenientes.

S.M.P. Lima, 30 de setiembre 2017

MSe. Maurtua Torres Dora  
Docente Microbiología – FCF - UPCH  
C.B.P. 776

DI/UPCH  
Archivo

Av. Honorio Delgado 430, Urb. Ingeniería, S.M.P. Lima – Perú.  
Teléfono: (51-1) 310 – 0000 // email: portalweb@upch.pe

**ANEXO N° 09**

**FOTOS**

**N° 01.** El *Citrus paradisi* “Tangelo” del fundo Santa Elena.



**N°02.** Secado del fruto *Citrus paradisi* “tangelo”



**N°03.** Pesado y secado de la cascara del *Citrus paradisi* "Tangelo"



**N°04.** Adaptación del equipo para la obtención del aceite esencial.



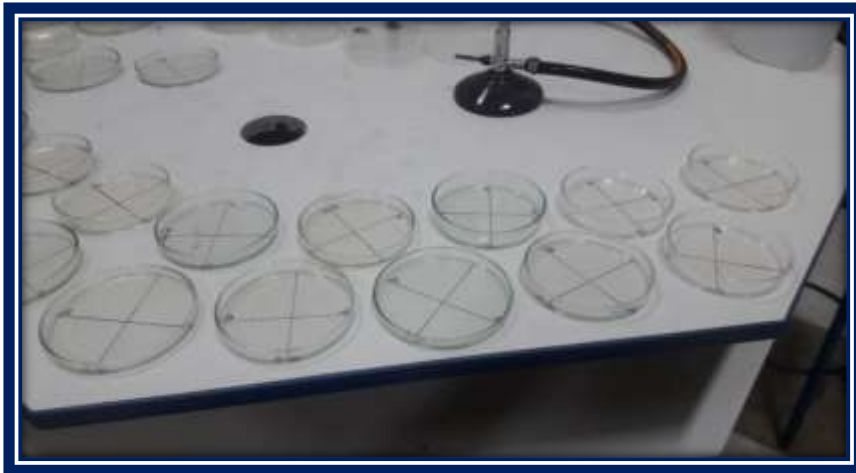
**N°05.** Decantación para la obtención del aceite esencial



**N°06.** Agar Müller Hinton en baño María



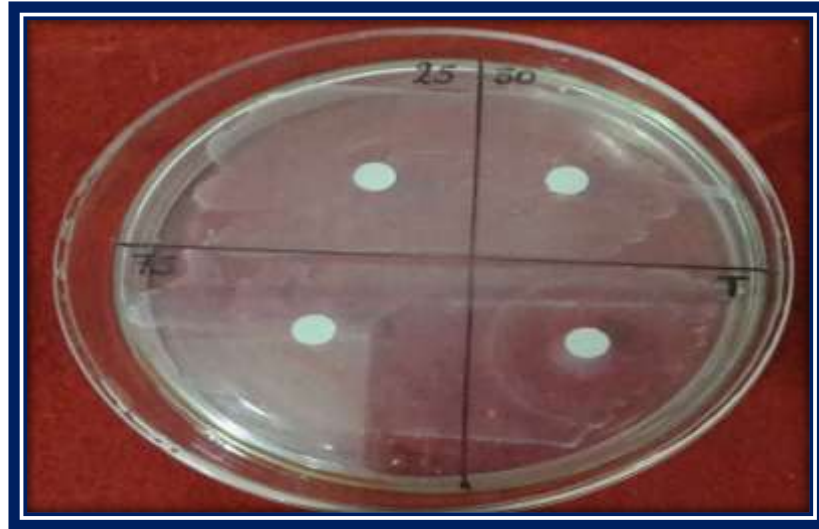
**N°07.** Placa Petri estéril para el servir el agar Müeller Hinton.



**N°08.** Placa Petri estéril para el servir el agar Müeller Hinton.



**N°09.** Distribución de los monodisco Whatman con sus diferentes concentraciones de *Citrus paradisi* (tangelo).



**N° 10.** Placas Petri en la estufa a temperatura de 37°.



**N°11.** Medición de concentración del 75%



**N°12.** Medición de concentración del 50%



**N°13.** Medición de concentración del 25%

