



## **FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

COMPARACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE  
ESENCIAL DE CÁSCARA DE CITRUS LIMÓN (LIMÓN) Y CÁSCARA DE CITRUS x  
SINENSIS (NARANJA) FRENTE AL STAPHYLOCOCCUS AUREUS CEPA ATCC  
25923 IN VITRO

**Línea de investigación:**  
**Salud pública**

Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

### **Autora**

Luna Canales, Grecia Gulletta

### **Asesor**

Casas Valverde, José

ORCID: 0000-0002-1641-5345

### **Jurado**

Paucar Rodríguez de Granados, Elizabeth

Escobedo Dios, José Humberto

Chuna Espinoza, Jorge Dante

**Lima - Perú**

**2025**

# COMPARACION DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE CASCARA DE CITRUS LIMON (LIMON) Y CASCARA DE CITRUS x SINENSIS (NARANJA) FRENTE AL STAPHYLOCOCCUS AUREUS CEPA ATCC 25923 IN VITRO

## INFORME DE ORIGINALIDAD

14%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional Federico Villarreal Trabajo del estudiante	3%
2	intra.uigv.edu.pe Fuente de Internet	2%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
4	repositorio.uigv.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	repositorio.unfv.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	repositorio.uwiener.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet	1%
8	Submitted to Universidad Catolica De Cuenca Trabajo del estudiante	<1%
9	Virginia Monserrate López-Zambrano, Alex Alberto Dueñas-Rivadeneira, José Daniel Zambrano-Veliz, Carlos Alfredo Cedeño-Palacios et al. "Chapter 4 Biotechnological Applications of Essential Oils: Post-harvest	<1%



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

COMPARACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL  
DE CÁSCARA DE *CITRUS LIMÓN* (LIMÓN) Y CÁSCARA DE *CITRUS x SINENSIS*  
(NARANJA) FRENTE AL *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CEPA ATCC 25923 *IN VITRO*

**Línea de investigación:**

Salud Pública

Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

**Autora**

Luna Canales, Grecia Gulletta

**Asesor**

Casas Valverde, José

ORCID: 0000-0002-1641-5345

**Jurado**

Paucar Rodríguez de Granados, Elizabeth

Escobedo Dios, José Humberto

Chuna Espinoza, Jorge Dante

**Lima – Perú**

**2025**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi madre, mi Toñita ella desde el cielo siempre guío mis pasos y ahora Dios mediante estoy siguiendo todo lo que ella me inculcó desde pequeña, todo mi esfuerzo es por y para ella. También se lo dedico a mi papá y hermanos por su motivación en todo momento.



## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad, por brindarme los años más lindo en mi etapa universitaria guiándonos en ser los mejores profesionales. Agradezco a mi asesor Dr. Casas por su apoyo en la aceleración del proceso de mi investigación, también agradezco a mi novio y amigos por ser el impulso y motivación diario en este proceso.

## ÍNDICE

RESÚMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Descripción y formulación del problema.....	2
1.2. Antecedentes.....	2
1.3. Objetivos.....	5
1.1.1. Objetivo genera.....	5
1.1.2. Objetivos específicos.....	5
1.4. Justificación.....	6
1.5. Hipótesis.....	6
<b>II. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>7</b>
2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	7
2.1.1. Biofilm.....	7
2.1.2. Staphylococcus aureus.....	10
2.1.3. Fitoterapia.....	11
2.1.4. Aceites esenciales.....	13
2.1.5. Citrus limón.....	14
2.1.6. Citrus x sinensis.....	15
<b>III. MÉTODO.....</b>	<b>16</b>
3.1. Tipo de investigación.....	16
3.2. Ámbito temporal y espacial.....	16
3.3. Variables.....	16
3.1.1. Variable independiente.....	16
3.1.2. Variable dependiente.....	16

3.1.3. Covariable .....	16
3.1.4. Operacionalización de variables.....	17
3.4. Población de muestra.....	18
3.1.1. Población.....	18
3.1.2. Muestra.....	18
3.5. Instrumento .....	18
3.1.1 Materiales .....	18
3.1.2 Insumos .....	19
3.6. Procedimientos.....	20
3.6.1. Elaboración de aceite esencial .....	20
3.6.2. Fase pre analítica .....	21
3.6.3. Fase analítica .....	22
3.6.4. Fase post analítica .....	24
3.7. Análisis de datos .....	24
3.8. Consideraciones éticas .....	24
IV. RESULTADOS .....	25
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	32
VI. CONCLUSIONES .....	35
VII. RECOMENDACIONES.....	36
VIII. REFERENCIAS.....	37
IX. ANEXOS .....	42
9.1 Anexo A.....	42
9.1.1 Matriz de consistencia .....	42
9.2 Anexo B.....	45
9.2.1 Ficha de recolección de datos.....	45

9.3	Anexo C.....	46
9.3.1	Certificado de Agar Mueller Hinton.....	46
9.4	Anexo D... ..	47
9.4.1	Fotografías .....	47
9.5	Anexo E.....	51
9.5.1	Reporte de análisis.....	52
9.6	Anexo F .....	53
9.6.1	Certificado cepa bacteriana .....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x sinensis (naranja) al 50%, 75% y 100% en 24 horas frente al <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.....	25
<b>Tabla 2.</b> Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x sinensis (naranja) al 50%, 75% y 100% en 48 horas frente al <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.....	27
<b>Tabla 3.</b> Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x limón (limón) al 50%, 75% y 100% en 24 horas frente al <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.....	28
<b>Tabla 4.</b> Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x limón (limón) al 50%, 75% y 100% en 48 horas frente al <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.....	29
<b>Tabla 5.</b> Comparación de los aceites esenciales en sus distintas concentraciones para evaluar su eficiencia antimicrobiana frente al <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x sinensis (naranja) al 50%, 75% y 100% en 24 horas frente al <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.....	26
<b>Figura 2.</b> Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x sinensis (naranja) al 50%, 75% y 100% en 48 horas frente al <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.....	27
<b>Figura 3.</b> Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x limón (limón) al 50%, 75% y 100% en 24 horas frente al <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.....	28
<b>Figura 4.</b> Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x limón (limón) al 50%, 75% y 100% en 48 horas frente al <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.....	29
<b>Figura 5.</b> Comparación de los aceites esenciales en sus distintas concentraciones para evaluar su eficiencia antimicrobiana frente al <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.....	31

## RESUMEN

**Objetivo:** Comparar la efectividad antibacteriana del aceite esencial de la cáscara de *Citrus limón* (limón) y cáscara de *Citrus x sinensis* (naranja) frente al *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 *in vitro*. **Método:** Estudio experimental con enfoque comparativo prolectivo, los aceites fueron realizados por el método de hidrodestilación, para luego ser diluido en tres concentraciones: 50%, 75% y 100%, y así medir su eficiencia antibacteriana frente al *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 a través de los halos de inhibición formados en cada pocillo medidos por un caliper digital. **Resultados:** La propiedad antibacteriana de los aceites esenciales de *citrus x sinensis* y *citrus limón*, a través de la prueba de estadística inferencial de T de Student, se comprobó que existe diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos al presentar un  $p < 0.05$ , donde el aceite esencial de *citrus x sinensis* superó al aceite esencial de *citrus limón*, con una media de 22.5 mm sobre una de 16.2 mm, ambas en sus diluciones al 100% a las 24 hrs, acercándose al grupo control de Clorhexidina al 0.12%, el cual obtuvo una media de 23.9 mm. **Conclusiones:** El aceite esencial de *citrus x sinensis* demostró ser más efectivo en sus tres diluciones al 50%, 75% y 100% frente al aceite esencial de *citrus limón*, a las 24 y 48 hrs, igualando valores al del grupo control que fue Clorhexidina al 0.12%.

*Palabras clave:* efectividad antimicrobiana, aceite esencial, *Citrus limón*, *Citrus x sinensis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

## ABSTRACT

**Objective:** Compare the antibacterial effectiveness of the essential oil of the peel of Citrus lemon (lemon) and peel of Citrus x sinensis (orange) against Staphylococcus aureus strain ATCC 25923 in vitro. **Method:** Experimental study with a comparative prolective approach, the oils were made by the hydrodistillation method, to then be diluted in three concentrations: 50%, 75%b and 100%, and thus measure their antibacterial efficiency against Staphylococcus aureus strain ATCC 25923 through the inhibition halos formed in each well measured by a digital caliper. **Results:** The antibacterial property of citrus x sinensis and citrus limon essential oils, through the inferential statistical test of Student's T, it was found that there is a statistically significant difference between the results obtained when presenting a  $p < 0.05$ , where citrus x sinensis essential oil surpassed citrus limon essential oil, with a mean of 22.5 mm over one of 16.2 mm, both in their 100% dilutions at 24 hours, approaching the control group of Chlorhexidine at 0.12%, which obtained a mean of 23.9 mm. **Conclusions:** Citrus x sinensis essential oil proved to be more effective in its three dilutions at 50%, 75% and 100% compared to citrus limon essential oil, at 24 and 48 hrs, equaling values to the control group which was 0.12% chlorhexidine.

*Keywords:* antimicrobial effectiveness, essential oil, Citrus limón, Citrus x sinensis, Staphylococcus aureus ATCC 25923

## I. INTRODUCCION

El microbiota bucal está constituido por diferentes microorganismos, en los cuales tenemos bacterias, hongos, virus, y parásitos, y se estima un alrededor de setecientos macroorganismos. Que, cuando existe un desequilibrio en el microbiota bucal, se presentan ciertos cuadros patológicos.

El ser humano desde épocas pasadas como es el caso del incanato, utilizaba ciertas plantas y frutas como elementos para aliviar ciertas afectaciones en su salud, como es el caso de la coca como elemento anestésico o como la hoja de la pimienta que se usaba para curar enfermedades de la piel.

La actividad antimicrobiana de los aceites tiene relación con sus componentes químicos estudios al respecto han demostrado su eficacia frente a varios agentes patógenos, como es el caso del *Staphilococcus Aureus*, esto propone una alternativa natural en el alivio de ciertas alteraciones patológicas de la cavidad bucal.

La fitoterapia a sido y sigue siendo una alternativa gracias a sus propiedades fitoquímicos y flavonoides que contienen la cáscara de algunos frutos como por ejemplo naranja, limón, toronjas, mandarina; las cuales tienen propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, entre otras.

Por lo cual, gracias a las propiedades de estos frutos, se realizó un estudio comparativo de la efectividad antibacteriana del aceite esencial de la cáscara de *citrus limón* (limón) y cáscara de *citrus x sinensis* (naranja) frente al *Staphylococcus aureus*. Mediante el proceso de hidrodestilación obtuvimos el aceite de ambas cáscaras para luego inocular el microorganismo *Staphilococcus aureus* en agares de cultivo en las cuales se medirá su concentración mínima inhibitoria a través de los halos de inhibición por medio de un caliper digital por intervalos de tiempo de 24 y 48 hrs a distintas concentraciones para poder relaciones los datos y averiguar su eficacia bactericida y bacteriostática.

### 1.1. Descripción y formulación del problema

Existen muchos productos químicos para combatir determinadas enfermedades en este caso de la cavidad bucal, pero que muchas veces tienen efectos colaterales que afectan al ser humano, por esto se busca alternativas naturales para combatir ciertas patologías.

El propósito de esta investigación es determinar la efectividad antimicrobiana de dos aceites obtenidos de dos frutos cítricos como el limón y la naranja mediante un estudio *in Vitro*. Esta investigación es esencialmente comparativa y experimental la cual se realizará en un total 16 muestras por cada porcentaje de cada aceite.

Los resultados demostrarán si las esencias de aceite de la cáscara de naranja o del limón son más efectivas ante la presencia del *Staphylococcus Aureus* cepa ATCC 25923.

Por este fin se plantea esta pregunta ¿Cuál es la efectividad antibacteriana del aceite de cáscara de *citrus limón* (limón) y la cáscara de *citrus x sinensis* (naranja) frente al *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 *in vitro*?

### 1.2. Antecedentes

Santos (2025) en Brasil, recopiló distintos artículos para realizar una revisión sistémica y así averiguar sobre el potencial de aceites esenciales del género *citrus* y sus distintas propiedades antimicrobianas. En sus resultados, los artículos confirmaron que frente a diversos microorganismos como las bacterias y hongos mostraron una eficacia más que aceptable, gracias a los compuestos bioactivos como el limoneno, el linalol, y el citral, que les otorgaron sus propiedades antimicrobianas. El autor de este artículo sugiere que, como su potencial antimicrobiano fue alto, su uso como coadyuvante antibacteriano puede quedar en segundo plano, y llegar a remplazar la utilización de compuestos químicos elaborados por laboratorios. Entre los microorganismos. En esta revisión los principales microorganismos afectados fueron la *Escherichia coli*, el *Staphylococcus aureus*, donde el principal mecanismo de acción de estas

biomoléculas fue la destrucción de la bicapa lipídica ubicada en la pared celular, lo que ocasionó su destrucción.

León (2024) en Brasil, desarrolló un soporte impregnado a partir del aceite esencial de *Citrus sinensis*, obtenido por hidrodestilación de su pericarpio (cáscara), se evaluó su composición por medio de un espectrómetro de masa. Las concentraciones del aceite fueron al 2% y 1.5%, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En los resultados dados por el espectrómetro de masa, los monoterpenos fueron los que se encontraron en mayor número, como el Limoneno, el  $\beta$ -mercenio y el linalol. En cuenta a su actividad antibacteriana, mostró resultados positivos inhibiendo el crecimiento de estas bacterias y eliminándolas.

Anwar (2023) en India, estudio el poder antibacterial y antifúngico del aceite esencial de *Citrus sinensis*, realizados por destilación sólido-liquido a través del Soxhlet. Los microorganismos analizados fueron tres cepas bacterianas y tres fúngicas, entre ellas el *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus flavus*, utilizando como grupo control a la Anfotericina – b. Las pruebas para evaluar su poder antimicrobiano fueron a través de mediciones por medio de un caliper digital a los halos inhibitorios formados alrededor de los pocillos impregnados con el aceite esencial. Se obtuvo como resultado que el mayor halo inhibitorio fue contra la *Escherichia coli*, siendo de 14 mm. Se demostró que el aceite esencial de *Citrus sinensis* poseía efectos antibacterianos.

Jiménez (2022) llevó a cabo una revisión sistemática en Ecuador sobre las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los aceites esenciales obtenidos de *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi* y *Citrus reticulada*. A partir del análisis de múltiples fuentes, se concluyó que su actividad antimicrobiana podría estar relacionada con la presencia de taninos, saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, entre otros componentes bioactivos. Asimismo, se identificó que la efectividad antibacteriana de estos aceites varía en función del grado de maduración del fruto.

Sin (2021) en Argentina, desarrolló una revisión sistemática enfocada en la actividad antibacteriana de diversos aceites esenciales y su posible aplicación en odontología. Entre los compuestos analizados se encontraron aceites provenientes de cáscara de naranja y limón, del género *Citrus*, los cuales demostraron capacidad para interferir en la síntesis y función de ácidos nucleicos, afectando procesos metabólicos esenciales a través de alteraciones en la permeabilidad de la membrana bacteriana, lo que conduce a su desintegración. Este efecto fue evidenciado en cepas como *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*.

Tupayachi (2024) en Perú, realizó estudios sobre la composición citoquímica del aceite esencial de *citrus limón* y su eficacia antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El aceite se obtuvo a través de hidrodestilación, a una concentración de 0.315 %. En la evaluación de sus componentes bioactivos a través de los gases por cromatografía, se encontró que el Limoneno ocupaba el mayor porcentaje en la composición. Para la prueba de sensibilidad bacteriana se utilizó el método de conteo de unidades formadoras de colonias para cada microorganismo bacteriano. Se tuvo como resultado que a las 24 y 48 hrs de realizado el cultivo, se obtuvo una respuesta positiva referente a su propiedad antimicrobiana.

Luque (2021) en Perú, evaluó tanto la eficacia antibacteriana como el poder antioxidante del aceite esencial de *citrus sinensis* frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 12228, donde se utilizó una muestra de 8 pocillos por grupo. Para la elaboración del aceite esencial se utilizó el método líquido-líquido, diluyéndolo en tres concentraciones, de 30%, 50% y 70%. Para evaluar la eficacia antibacteriana se utilizó el método de sembrío en agar para medir los halos de inhibición formadas alrededor de los pocillos impregnados con aceite, y para el poder antioxidante, a través de la prueba reactiva por el método de DPPH, la cual resultó positiva. Respecto a su

efecto bactericida, mostró buenos resultados antes de las cepas bacterianas de esta investigación, siendo ante el *S. aureus* 16 mm su pico más alto, y frente a la *E. coli*, 7.6 mm.

Ramírez (2019) evaluó la actividad inhibitoria del aceite esencial de *Citrus x sinensis* frente a *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus epidermidis*. El aceite fue extraído mediante hidrodestilación y analizado con el método de microdilución en caldo, determinándose que una concentración de 450 µg/mL era suficiente para inhibir el crecimiento de *S. mutans*, estableciendo esta cifra como la concentración mínima efectiva en su estudio.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

- Comparar la efectividad antibacteriana del aceite esencial de la cáscara de *Citrus limón* (limón) y cáscara de *Citrus x sinensis* (naranja) frente al *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 *in vitro*.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Determinar la concentración inhibitoria de la cáscara de *Citrus x sinensis* (naranja) al 50%, 75% y 100 % en 24 hrs frente al *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923.
- Determinar la concentración inhibitoria de la cáscara de *Citrus x sinensis* (naranja) al 50%, 75% y 100 % en 48 hrs frente al *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923.
- Determinar la concentración inhibitoria de la cáscara de *Citrus limón* (limón) al 50%, 75% y 100 % en 24 hrs frente al *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923.
- Determinar la concentración inhibitoria de la cáscara de *Citrus limón* (limón) al 50%, 75% y 100 % en 48 hrs frente al *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923.
- Comparar los aceites esenciales en sus distintas concentraciones para evaluar su eficiencia antimicrobiana frente al *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923.

#### **1.4. Justificación**

Encontrar cuál de las dos cáscaras de los frutos cítricos (limón y naranja) tendrá mayor efecto microbiano frente al *Staphylococcus aureus* que es uno de los microorganismos más frecuentes en enfermedades gingivales, así mismo dando alternativa natural en los procesos infecciones para combatirlo.

Aumentar el conocimiento que se tiene sobre estos frutos en el campo de la investigación relacionada a la salud dental y salud pública, ya que, al aumentar la literatura respecto a sus beneficios, puede ser usada, a futuro, como un coadyuvante natural, en reemplazo de los productos químicos usados, o como parte de la composición de productos que ayuden en la salud oral.

Utilizar nuevos métodos que protejan el medio ambiente, como es el reciclaje de fuentes orgánicas, y que también posean un potencial beneficio en la salud de las personas.

#### **1.5. Hipótesis**

El aceite esencial de la cáscara de *Citrus limón* será menos efectivo que el aceite esencial de cáscara de *Citrus x sinensis* frente al *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 *in vitro*.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

#### 2.1.1. *Biofilm*

La cavidad bucal y sus múltiples estructuras, como son la lengua, encías, dientes, paladar, etc., poseen diversas texturas, morfología, temperaturas, y distintos mecanismos fisiológicos propios de cada uno; gracias a estas condiciones particulares, es posible que una gran diversidad de microorganismo desarrolle un ambiente idóneo para su proliferación.

Esta diversidad de microorganismo, que en conjunto forman una comunidad o también denominada microbiota oral, tiene un rol importante en la defensa del huésped. Existen más de setecientas especies bacterianas que conviven en esta microbiota oral, las cuales son indispensables para mantener el equilibrio biológico, y, por consecuencia, la salud oral. (Sarduy, 2016).

La boca funciona como un ecosistema dinámico donde múltiples microorganismos han aprendido a convivir gracias a sus múltiples métodos de adaptación y fisiologías diversas, esto sumado a que en la boca también existen nichos que facilitan su fijación en este ecosistema. Uno de esos nichos, son los tejidos del surco gingival, las superficies de las piezas dentarias, la lengua, y las diversas mucosas que se encuentran recubriendo la cavidad oral.

Todo este proceso inicia con la formación de una película delgada, en la cual las colonias bacterianas pueden proliferar, debido a que está compuesta por glicoproteínas salivales, las cuales tienen un gran poder adherente en las superficies dentales. Los microorganismos se fijan sobre estas glicoproteínas, y realizan un intercambio entre las adhesinas bacterianas y los receptores glicoproteicos de la biopelícula formada, este proceso fortalece aún más la adherencia química de estos microorganismos. Entre estos microorganismos pioneros, tenemos a los *Streptococcus* orales, como el mutans o el *mitis*, o bacilos gran negativos. Pasado el tiempo, y el biofilm ya se encuentre consolidado, es capaz de

albergar bacterias tanto gram positivas como gram negativas, lo que aumenta su proliferación bacteriana y desarrollo, para luego distribuirse a distintas zonas, como los tejidos blandos, lengua, amígdalas, etc. (Fiehn, 2017).

A medida que el biofilm madura, el metabolismo de los microorganismos que la habitan incrementa, gracias a los nutrientes proporcionados por la saliva. Esto abre paso a la formación de una matriz extracelular, que aumenta y facilita el proceso de adhesión sobre las superficies dentales, y brinda protección al ecosistema bacteriano. Como en cualquier biofilm que se encuentre en el organismo humano, este biofilm oral también posee un sistema de comunicación, llamado detección de quorum, en el cual las moléculas autoinductor 1 y autoinductor 2 cumplen roles de estructuración y virulencia. (Marsh, 2016)

Este biofilm resultante es el principal culpable de la aparición de patologías bucales en las estructuras dentarias y tejidos blandos. Por ejemplo, la caries dental, la cual es la responsable de la pérdida progresiva de los tejidos minerales de la pieza dental, que, de no ser tratada, puede evolucionar y ocasionar infecciones en tejidos adyacentes, como son el tejido periodontal, a través de una periodontitis apical, o una pulpitis irreversible. En el caso de enfermedades a nivel periodontal, tenemos a la gingivitis y periodontitis; y en el caso de implantes dentales, a la periimplantitis, ya que el biofilm ocasiona una respuesta inflamatoria en estos tejidos de soporte. (Marsh, 2016).

**2.1.1.2. Microorganismos en la cavidad oral.** La boca es el punto de acceso para múltiples microorganismos que se encuentran dispersos en el medio ambiente, por lo que, es un hábitat propicio para su desarrollo, formación y proliferación. Aproximadamente, se encuentran alrededor de 6 mil millones de microorganismos entre bacterias y virus. Entre estos microorganismos hay una relación que les permite obtener ventajas para su desarrollo y evolución, formando así comunidades bacterianas. (Cruz, 2016)

Debido a los múltiples microorganismos que habitan la cavidad oral, y sus diferentes

metabolismos y variables, es muy difícil saber la composición microbiana de estos microecosistemas. Se han logrado aislar hasta 200 microorganismos distintos de la cavidad oral, la mayoría de estos, se encontraban de forma transitoria, solo el 20% eran residentes de este microbiota.

Y no únicamente es habitado por bacterias, ya que este microsistema sirve de refugio para hongos y virus. Siendo aproximadamente alrededor de setecientos en total. La mayor parte de este grupo de microorganismos son comensales, y el menor porcentaje, es considerado patógeno oportunista alojado en el biofilm oral, y dentro de este pequeño porcentaje, algunos microorganismos pueden ocasionar infecciones sistémicas. Entre los microorganismos patógenos a considerar presentes en el biofilm oral, tenemos a la *Cándida albicans*, a la *Pseudomona aeruginosa*, el *Enterococcus faecalis*, a los *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*, y al *Staphilococcus aureus*. (Arweiler, 2016)

La literatura actual sobre los microorganismos y sus interrelaciones vinculadas al biofilm dental, fueron obtenidos a través de estudios de laboratorios por medio de cultivos y pruebas de sensibilidad y pruebas de biología molecular. Gracias a estas pruebas, las últimas investigaciones explican que aproximadamente solo el cincuenta por ciento de los microorganismos que habitan en el biofilm oral, pueden ser identificados por estos métodos, ya que los microorganismos que se encuentran en el biofilm oral varían tanto en personas como en ubicaciones de la cavidad oral.

Por este motivo, las enfermedades causadas en la cavidad oral raramente son dadas por patógenos externos, sino más bien, ocasionadas por las propias bacterias patógenas que se encuentran en el biofilm orales que, debido a ciertas circunstancias, se volvieron dominantes, y su desarrollo y proliferación aumentaron, y por ende, su virulencia. Esto toma el nombre de hipótesis del biofilm/ placa ecológica, donde diversos factores locales llevaron a cambios en el bioma oral, por ejemplo, los relacionas a la caries dental, o a las enfermedades periodontales.

Estos cambios son diferentes para cada patología que se presente en la cavidad oral (Winkelhoff, 2016).

### **2.1.2. *Staphylococcus aureus***

Es la bacteria más común residente en el cuerpo y causante de múltiples infecciones, dependiendo la cepa bacteriana y el foco de la infección, puede ocasionar infecciones invasivas y enfermedades dirigidas por toxinas. La fisiopatología también va a varias dependiendo de la zona y el tipo de infección. Este microorganismo se encuentra en el medio ambiente y en los epitelios como la piel, y las membranas mucosas que revisten a la cavidad oral, como huésped en personas sanas. (Espejo, 2019).

El medio por el cual se transporta esta bacteria es a través de las mucosas de las fosas nasales. Este microorganismo, puede estar presente en el huésped, siendo este portador persistente, intermitente y no portador, dependiendo de cuánto tiempo este con el microorganismo. Pero pese haya esta división, todos son propensos a la colonización bacteriana. Las infecciones causadas por esta bacteria tienen una gran tasa de morbilidad y mortalidad tanto en ambientes médicos como en sitios de uso común para la comunidad. En el caso de consultorios odontológicos, esta transmisión puede empezar por pacientes portadores del virus que entraron en contacto por medio de saliva con algún instrumento o insumo contaminándolo, o por el aerosol de la pieza de mano durante un tratamiento dental. (Luque, 2021).

Esta bacteria no inicia su patogénesis de forma directa, puesto que necesita de factores predisponentes para su virulencia, como son las manifestaciones clínicas de la bacteriemia, por medio de focos infecciosos, ya que estos favorecen los medios de transporte para su diseminación, ya que estos microorganismos por sí solos no son patogénicos y se encuentran en la piel y mucosas y pueden ocasionar procesos secundarios a distancia, pero si hay una lesión, esta bacteria activa su virulencia en este foco de microorganismos, causando una

infección.

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* en boca no suelen ser muy comunes, pero están presentes en los abscesos dentales, los cuales son acumulaciones de pus las cuales se desarrollaron alrededor de las piezas dentarias, producto de una infección bacteriana ocasionada por enfermedad periodontal o caries dental encontrándose en un quince por ciento de los casos estudiados, provocando síntomas como dolor, enrojecimiento del área infectada, sensación de ardor, etc. Como este organismo se encuentra como huésped natural del microbiota bucal, no se toma en cuenta en las tomas de muestras de saliva, ya que su participación como agente principal en enfermedades como la periodontitis tiene muy bajas probabilidades. Por ende, el odontólogo al tratar enfermedades de origen infecciosas en la cavidad oral se enfoca en contrarrestar a microorganismos como la *Porphyromona gingivalis* o la *Prevotella intermedia*, u otros de alta virulencia, mas no a al *Staphylococcus aureus*, ocasionando un fracaso terapéutico, iniciando posibles patologías sistémicas, como es la endocarditis infecciosa. (Mobili, 2017)

**2.1.2.1. Mucositis estafilocócica.** De acuerdo con los estudios de la doctora Luque (2017) la mucositis estafilocócica tiene como principal característica la ulceración e inflamación de los tejidos mucosos que revisten al tracto digestivo, ocurrido debido a tratamientos contra el cáncer como son la quimioterapia o la radioterapia. En algunas circunstancias, estas ulceraciones sirven de foco para la proliferación y desarrollo de microorganismo, que aprovechando la solución de continuidad que se encuentra en las mucosas, se puede movilizar a distintos tejidos, como, por ejemplo, a la mucosa de la cavidad oral.

### **2.1.3. Fitoterapia**

El uso de plantas y sus derivados con fines medicinales ha sido una práctica ancestral en distintas regiones del mundo. Ya que fue, durante mucho tiempo, la única forma de medicina

que existía, transmitida de generación en generación a los médicos. Esto dio como resultados que los médicos de aquellos tiempos se especializaran en el uso y la identificación de las distintas propiedades que poseían las diferentes plantas, hasta estos tiempos.

Los investigadores de la comunidad científica siempre han mostrado un interés profuso por las propiedades de las biomoléculas presentes en las plantas y sus subproductos, como los frutos y hojas, debido, a su amplio uso a través del tiempo en la prevención y tratamientos de distintas patologías. En la actualidad, múltiples investigaciones han demostrados los efectos farmacológicos de las plantas y su utilización para controlar inflamaciones, tratar infección y aliviar el dolor, eficacia antioxidante, y, hasta poder antitumoral. Respecto al área de odontología, la utilización de aceites esenciales ha sido probado y estudiado en distintas especialidades, como son la endodoncia, la periodoncia y el área de materiales dentales, respecto a su poder antimicrobiano y bacteriostático para tratar ciertas patologías como la caries dental y las afecciones gingivales. (Meccatti, 2022)

Los principios que trata la homeopatía hablan sobre enfrentar la enfermedad que se padezca, consumiendo sustancias que produzcan las mismas respuestas de defensas, que las que produce el sistema inmunitario del cuerpo humano cuando se está viendo atacado por algún patógeno. De esta manera, el organismo soluciona este problema patológico viéndose estimulado para reaccionar y defenderse por los efectos provocados por la sustancia consumida,

Esto es el resultado de las reacciones ocasionadas por los distintos componentes que se encuentran en las plantas y sus subproductos, variando en sus propiedades, cantidades y composición, dependiendo de su género y especie, o al habitat donde se encuentre. Los Componentes mencionados a continuación son los que se encuentran en mayor concentración en el género *citrus*.

Flavonoides: Se encuentran en muchas especies vegetales cumpliendo múltiples funciones. Estos tienen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y son muy eficaces para

producir una buena irrigación sanguínea. Tenemos múltiples flavonoides, entre estos los más importantes son las antocianinas, los polifenoles y los taninos, con gran impacto nutricional y medicinal. Se encuentran en frutas como el camu camu, los arándanos, la vid, el limón, etc.

Cumarinas: Posee diversas propiedades en el organismo y se encuentran en la mayoría de las plantas medicinales. Una de sus principales funciones es la regular el flujo sanguíneo, por ejemplo, con el meliloto. Otro ejemplo, sería su acción cuando se consume apio. Ya que cumple el rol de protector solar, o en la biznaga, cumpliendo el rol de relajando muscular de los músculos lisos

Terpenos: Este compuesto biológico perteneciente al grupo de los hidrocarburos, presenta múltiples propiedades, como su poder antimicrobiano y bacteriostático, así como antiinflamatorio, uno de sus principales representantes es el limoneno, que se encuentra en las cáscaras de la lima, limón, naranja, etc. Otro representativo es el mircenolol, que está incluido en múltiples aceites esenciales de varias plantas, posee efectos analgésicos y antiinflamatorios, se encuentra principalmente en hongos, cáscaras, lúpulo, yerba limón, etc.

Fenoles: Esta biomolécula también está presente en una gran cantidad de plantas, como el sauce blanco, y es utilizado en la fabricación de aspirinas, ya que uno de los insumos para su preparación, es el ácido salicílico. Otro fenol de gran importancia es el timol, el cual se encuentra en el tomillo. Las propiedades principales de este grupo su capacidad antiséptica y su poder antiinflamatorio, si son utilizados dentro del organismo, puesto que tienen un efecto irritante en la piel y mucosas expuestas. (Echegaray, 2017)

#### **2.1.4. Aceites esenciales**

Los aceites esenciales, son un conjunto de compuestos de biomoléculas extraídas por distintos métodos de hidrodestilación obtenidas de diversas partes de las plantas.

Este producto obtenido por hidrodestilación posee ciertas propiedades significativas, como son sus efectos antimicrobianos, antioxidantes, antifúngicos, entre otras. En los últimos

años, los estudios relacionados al área de la fitoterapia han aumentado, entiendo esta terapia como la utilización de productos naturales cuyas propiedades ayudan en el tratamiento y control de distintas patologías, con el propósito de disminuir el consumo y utilización de fármacos de origen químico y sintéticos. (Tupayachi, 2024).

En el área de la odontología, el uso de aceites esenciales ha tomado mucha importancia debido a las propiedades que presentan las plantas y sus frutos, gracias a sus componentes bioactivos y las propiedades antimicrobianas que presentan frente a múltiples microorganismos patógenos que se encuentran en la cavidad oral y son partes de biofilm oral. Los estudios actuales recopilados dan detalle del uso de estos aceites esenciales como parte de la fabricación en elementos de la higiene oral diarios como son los enjuagues bucales o las pastas dentales. Las funciones de estos productos fueron ayudar a la remoción química y mecánica del biofilm en las superficies dentarias y encías, y mitiga la halitosis, inhibiendo los desagradables compuestos volátiles producidos por microorganismos huéspedes de la cavidad oral.

#### **2.1.5. *Citrus limón***

Conocido comúnmente como limón, procede del árbol limonero, el cual es de tamaño mediano y su tronco posee espinas, Posee flores de colores blancas y púrpuras, con hojas ovalas y bordes acerrados con puntas elípticas. Su fruto, el limón, es de color amarillo verdoso cuando este maduro, posee una forma ovalada con diez segmentos la mayoría de las veces. Procede de Asia, específicamente del área sureste. Es cultivada en la Amazonía. Su composición química está conformada principalmente por limoneno, terpeno, sabinero, entre otras. (Klimek, 2020)

La principal materia prima de este fruto es su jugo, y los aceites esenciales que se pueden obtener a través de su cáscara y jugo. Se conocen sus propiedades en el ámbito nutricional y de medicina tradicional, pero sus verdaderas capacidades bactericidas y bacteriostáticas no se aprovechan debidamente, siendo subestimada en distintas áreas, como en la odontología.

El jugo de este fruto se a utilizado a través de muchos años como tratamiento para el escorbuto, antes del descubrimiento de los beneficios de la vitamina C. Estos conocimientos ancestrales han sido respaldados por investigaciones actuales en múltiples estudios científicos. Otros beneficios en la medicina tradicional que se le da a este jugo de limón son el tratamiento de la presión arterial, la menstruación irregular, los refriados, etc. (Clemente, 2015)

### **2.1.6. *Citrus x sinensis***

Conocida comúnmente como naranja dulce, pertenece a la familia de las *Rutáceas*, la cual tiene más de mil setecientas especies aproximadamente, y son residentes de países con clima templado y tropical. Los más conocidos de esta familia, son los cítricos, con el género *Citrus*, a donde pertenece la naranja dulce. (Favela, 2016)

La naranja dulce es el fruto del árbol de naranjo, el cual se caracteriza por tener un tronco corto y espinoso, con hojas y ramas vigorosas, de forma elíptica y agudas, en las ramas también posee espinas delgadas que no son muy visibles, y unas flores aromáticas de 5 pétalos de color blanco, que se encuentran agrupadas en ocasiones junto a las hojas, llegando así a su fruto, la naranja, el cual es jugoso y de sabor agrio dulce, que consta de tres partes, el exocarpo, o también llamado cáscara, la cual posee vesículas con aceites esenciales; el mesocarpio o albedo, que tiene una textura pomposa de color blanca; y el endocarpo o pulpa, la cual posee gajos o jugo. (Domínguez, 2016)

Las biomoléculas del aceite esencial de cáscara de naranja le otorgan propiedades antibacterianas ya que interfieren en la bicapa fosfolipídica de la membrana celular, ocasionando el incremento de la permeabilidad y pérdida de sus componentes celulares, y destruyendo el sistema de enzimas responsables de la respiración celular y de la elaboración de energía. (León, 2024)

### III. MÉTODO

#### 3.1. Tipo de investigación

Enfoque: Comparativo

Diseño: Experimental puro

Tiempo de ocurrencia de los hechos: Prolectivo

Periodo y secuencia de estudio: Longitudinal

#### 3.2. Ámbito temporal y espacial

El aceite esencial de cáscara de *Citrus limón* (limón) y cáscara de *Citrus x sinensis* (naranja) fueron realizados en facultad de Química de la UNMSM, y el cultivo de *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923, las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, bacteriostática, se realizaron en el Centro de Control Analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

#### 3.3. Variables

##### 3.3.1. Variable dependiente

Diámetro de halo de inhibitorio

##### 3.3.2. Variable independiente

Agente microbiano (*Staphylococcus aureus*)

##### 3.3.3. Covariable

Concentración del aceite de limón y la naranja

### 3.3.4. Operacionalización de variables

<b>VARIABLES</b>	<b>DEFINICIÓN</b>	<b>INDICADORES</b>	<b>ESCALA</b>	<b>VALOR</b>
<b>Concentración inhibitoria</b>	Capacidad de inhibir el crecimiento de determinada cepa	Tamaño del diámetro del halo de inhibición	Razón	Mm
<b>Concentración del aceite esencial de la cáscara de limón</b>	Cantidad del aceite esencial mínima para el efecto	Concentraciones del aceite por cada muestra	Razón	Mm
<b>Concentración del aceite esencial de la cáscara de la naranja</b>	Cantidad del aceite esencial mínima para el efecto	Concentraciones del aceite por cada muestra	Razón	Mm

### 3.4. Población y muestra

#### 3.4.1. Población

Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

#### 3.4.2. Muestra

Cantidad de muestra por cada disolución de aceite esencial al 50%, 75% y 100%: 16 muestras. Dando como resultado 48 muestras de aceite esencial de naranja, 48 muestras de aceite esencial de limón, 16 muestras del grupo control positivo, y 16 muestras del grupo control negativo, siendo un total de 128 pocillos.

$$n = \frac{2(1,96 + 0,842)^2 (1,0)^2}{(1)^2}$$

N=16

### 3.5. Instrumentos

Los datos recolectados se anotaron en una ficha de recolección de datos diseñada por el investigador, la cual fue dividida en grupos experimentales y los grupos de controles positivos y negativos, donde se colocó los números de concentraciones de cada aceite esencial de cáscara de naranja y limón frente al *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923, el cual se subdivide en concentraciones al 50%, 75% y 100% y en intervalos de tiempos de 24 y 48 hrs.

Los halos de inhibición fueron medidos en milímetros por medio de un caliper digital.

#### 3.5.1. Materiales

Placas Petri de vidrio 90 mm de diámetro x 15mm de altura

Asa de Drigalsky de vidrio

Tubos 150 mm con tapa rosca

Viales de vidrio de 5mL de capacidad

Puntas para micropipeta de 20-200 µL

Puntas para micropipeta de 0.5-5 mL

Micropipeta calibrada de 20-200  $\mu$ L

Micropipeta calibrada de 0.5-5 mL

Frascos de vidrio de 500 mL de capacidad con tapa rosca

Frascos de vidrio de 200 mL de capacidad con tapa rosca

Viales de vidrio de 10 mL de capacidad.

Sacabocado con diámetro interno de 6mm

Asa bacteriológica

Escala de Mac Farland

Indicador multiparámetro de esterilización.

Vernier digital

### **3.5.2. Insumos**

Limón 5 Kilogramos

Naranja 5 kilogramos

Caldo de TSB marca OXOID

Agar de TSA marca BD

Agar Mueller Hinton marca OXOID

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Cloruro de sodio grado bacteriológico marca Oxoid

Incubadora 35°C EQ-CCA-026 Labor LP-11 S: 69-6315/4

Autoclave Vertical Digital EQ-CCA-054 Reles AL/D 50L S: 476-15

Potenciómetro EQ-CCA-005 Inolab 730 S: 10380849

Baño María EQ-CCA-009 Memmert WNE-10 S: L307.0363

Balanza analítica EQ-CCA-037 AND HR 250 AZ S: GA7702480

Estufa EQ-CCA-001 Memmert UN55 S: B215-2490

### **3.6. Procedimientos**

#### ***3.6.1. Elaboración de aceite esencial***

Para la elaboración de los aceites esenciales de citrus sinensis y citrus limón, se obtuvo 5 kilogramos de cada fruto, recolectados de la provincia de Chanchamayo, en el departamento de Junín, para así obtener por cada fruto, 6ml de naranja, y 3 ml de limón.

El método utilizado para la obtención del aceite, fue el de hidrodestilación, se pelaron las naranjas y limones, obteniendo 2 kg de cáscara por cada fruta, luego, las cáscaras fueron llevadas a un balón de destilación de fondo redondo, con capacidad para 250 mg., fue calentada mediante una estufa donde se le agrego el disolvente, que en esta ocasión fue agua destilada, para luego ser calentada hasta la temperatura de ebullición, por medio de una fuente directa de calefacción a través de una resistencia eléctrica.

El balón de destilación debe ir conectado a un condensador recto, el cual estará ensamblado en el otro extremo con un sistema de enfriamiento, el cual puede ser una fuente de agua fresca.

Terminado el proceso de ebullición, el vapor resultante pasará por un el aparato de Clevenger, hasta el condensador, donde su fase cambiará, y se verá la separación entre aceite y fase acuosa, tomando un tiempo de 3 horas, para luego ser retirada por medio de una pipeta y almacenada en un frasco ámbar, alejado de la luz solar, y a temperatura ambiente.

Después de terminado el proceso de obtención de los aceites esenciales, seguimos con las pruebas de sensibilidad bacteriana, utilizando el método de Kirby Bauer, a través del método de difusión por placa, para probar el poder de antibióticos frente a un microorganismo específico, y así comprobar su actividad antimicrobiana. Este método fue modificado para así reemplazar el antibiótico por el uso de aceite esencial y así evaluar sus propiedades antimicrobianas frente al *Staphylococcus aureus*.

### **3.6.2. Fase pre analítica**

**3.6.2.1. Preparación de materiales.** Las placas petris fueron forradas con papel de grado médico y llevadas a esterilizar en calor seco a una estufa por dos horas a 180°C. A calor húmedo fueron llevados los tubos con tapa rosca, las micropipetas, los viales, durante 15 minutos a 121°C y 15 lb/pg<sup>2</sup>

**3.6.2.2. Preparación de los medios de cultivo.** En dos tubos de ensayo, previamente esterilizados, se preparó 20 mL de agar Tryptic Soy Broth, dosificando 30 gr por cada litro de agua destilada utilizada. Al mismo tiempo, se preparó en un frasco de vidrio, 100 mL de agar Tripticasa Soya, diluyendo 40 gramos en un litro de agua destilada, para luego ser esterilizado en calor húmedo. Una vez esterilizado, se llevó a baño a maría a cuarenta y cinco grados Celsius, para luego ser vertidas en placas petris.

Por último, se elaboró el tercer agar, el de Mueller Hinton, diluyendo treinta y cuatro gramos por cada litro de agua destilada, para poder obtener 1.6 litros de agar. Para luego ser autoclavado durante quince minutos a 121°C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>. Finalizado la esterilización, se llevó a enfriar a baño a maría a cuarenta y cinco grados Celsius, una vez llegada a la temperatura óptimo, fue vertido en placas petris esterilizada, de manera uniforme, llegando a un fonde de 4mm de altura por placa, equivaliendo a treinta mililitros por placa petri, las cuales tienen un diámetro de 90 mm, Terminado esto, se dejó solidificar a temperatura ambiente.

El agar Mueller Hinton debe encontrarse en un rango de 7 a 7.6 respecto a su pH, el cual se puede identificar por medio de un potenciómetro, colocando el electrodo de este, dentro del agar, antes de su esterilización

Como último paso en la preparación de los medios de cultivo, se preparó cien mililitros de suero fisiológico estéril, disolviendo novecientos gramos de cloruro de sodio en agua destilada hasta obtener 10 mililitros, este proceso se repitió diez veces, posteriormente, se llevó a esterilizar en calor húmedo. Se separaron 40 mililitros de suero fisiológico estéril, y fueron

distribuidos en 4 tubos de ensayo estériles.

**3.6.2.3. Activación de la cepa.** Las cepas bacterianas estaban almacenadas a una temperatura de entre cuatro y ocho grados Celsius en placas petris con agar Tripticasa Soya. Por medio de un asa bacteriológica, se tomó una colonia de *Staphylococcus aureus* y se sembraron en los tubos con caldo de agar Tryptic Soy Broth esterilizados previamente en la fase de preparación de inóculos, y fueron llevados a una incubadora por veinticuatro horas a una temperatura de treinta y siete grados. Por medio de una prueba de turbidez se confirmó el crecimiento óptimo de la cepa bacteriana. Pasado el tiempo de incubación, se llevó la cepa bacteriana de los tubos a placas petris estériles con agar Tripticasa soya, e incubada a una temperatura de treinta y siete grados por veinticuatro horas.

**3.6.2.4. Preparación de la muestra.** Para ambos aceites, se trabajó en tres concentraciones distintas, al 50%, 75% y 100%. Para el aceite de limón, la concentración al 75% fue obtenida diluyendo 375 uL del 100% del aceite con 125 uL de dimetilsulfóxido, y para el 50%, se diluyó 250 uL de dimetilsulfóxido en 250uL de aceite esencial al 100%

Para el caso del aceite esencial de naranja, la obtención del 75% de aceite se obtuvo añadiendo 250 uL de dimetilsulfóxido a 750uL del 100% de aceite esencial de naranja; y para el 50%, se diluyó 500 ul de dimetilsulfóxido con 500 uL de aceite esencial de naranja al 100%

### **3.6.3. Fase analítica**

**3.6.3.1. Preparación del inóculo.** Se tomaron colonias puras de *Staphylococcus aureus* que se encontraban en las placas petris con agar Tripticasa Soya, y fueron llevadas a los 4 tubos de ensayo estériles que tenían los 10 mL de suero fisiológico estéril, para así medir su turbidez a través de la escala de MacFarland, donde la disolución tenía relación con el tubo N° de dicha escala, con una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/mL. A partir de esta concentración en los tubos, se realizó disoluciones de 1 en 3, para obtener soluciones resultantes de  $1 \times 10^8$  UFC/mL, diluyendo tres mililitros de solución en nueve mililitros de suero fisiológico estéril, y luego

almacenados en tubos de ensayo a temperatura ambiente.

**3.6.3.2. Inoculación de las placas.** En las 32 placas petris preparadas con agar Mueller Hinton, fueron agregados 100 uL de los inóculos bacterianos realizados en el paso anterior, de concentración  $1 \times 10^8$  UFC/mL, luego, fueron esparcidos de manera homogénea con movimientos paralelos por toda la placa petri con la ayuda de una espátula de Drigalsky, de forma compacta por toda su superficie, Este procedimiento se vuelve a realizar, rotando la placa en sesenta grados, dos veces más. Este procedimiento debe realizarse con extremo cuidado, pues de hacerlo de forma incorrecta puede ocasionar errores en la recopilación de resultados y por ende llevar al sesgo. Terminado el proceso de inoculación, se dejó reposar por cinco minutos, para luego colocar los pocillos.

**3.6.3.3. Formación de los pocillos.** El socabacados fue esterilizado sumergiéndolo en alcohol y luego flameado en un mechero bunsen, y luego se hicieron los pocillos con un diámetro de 6 mm, para las 16 placas donde se analizaría el aceite de limón, se colocaron 3 pocillos, y para los otros 16 donde se analizó el aceite esencial de naranja, se colocaron 5 pocillos, donde estaban incluidos el grupo control positivo y negativo. Su distribución debe ser tal que los halos inhibitorios no se vayan a encontrar superpuestos uno de otro, y que los pocillos se encuentren a más de 15mm del borde la placa petri.

**3.6.3.4. Sembrado de las muestras y controles.** Las 32 placas petris fueron divididas en dos grupos de 16 placas cada aceite esencial. En el aceite esencial de cáscara de limón se utilizaron 3 pocillos por placa. Estos pocillos fueron impregnados con 30 uL cada uno, utilizado cada una de sus concentraciones al 50%, 75% y 100%.

Para el aceite esencial de cáscara de naranja, fueron necesarios 5 pocillos por placa, tres pocillos para cada concentración del aceite esencial (50%, 75% y 100%), un pocillo para el grupo control positivo, el cual fue clorhexidina al 0.12%, y último pocillo para el grupo control negativo, el cual fue agua estéril. En este grupo por cada pocillo, se le agrego 40 uL de cada

solución.

**3.6.3.5. Incubación.** Las 32 placas petris inoculadas con los grupos experimentales y controles fueron llevadas a una incubadora a una temperatura de treinta y siete grados Celsius durante 24 y 48 horas.

#### **3.6.4. Fase post analítica**

Al término de las 24 y 48 horas, fueron tomadas las lecturas de diámetro de halo de inhibición por cada pocillo. Para esto, cada zona de inhibición debe estar bien definida, teniendo una forma circular y una distribución homogénea para la toma de resultados. Los diámetros se midieron en milímetro, Por cada pocillo, se realizaron tres tomas de medidas, luego se promedió y el resultado obtenido fue redondeado para escribirlo en la ficha de recolección de datos como un número natural.

#### **3.7. Análisis de datos**

Los datos fueron recolectados en una ficha, la cual fue transcrita en el programa Excel, y exportadas al software SPSS 27, donde se realizaron las pruebas de estadística descriptiva por medio de análisis de medias, desviación estándar y cantidades de muestra, y estadística inferencial a través de la prueba estadística T de student. Los resultados obtenidos fueron plasmados en tablas y gráficos de barras.

#### **3.8. Consideraciones éticas**

Esta investigación fue realizada *in vitro*, donde se utilizó porcentajes estandarizados para el uso en laboratorio. Los resultados fueron científicamente comprobados.

Los gastos de esta investigación fueron financiados por el propio investigador.

#### IV. RESULTADOS

Los aceites esenciales fueron realizados en la facultad de Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y los análisis de sensibilidad antimicrobiana frente al *Staphilococcus aureus*, en el Centro de Control Analítico de la facultad de Farmacia y Bioquímica, donde cada aceite fue diluido en tres concentraciones al 50%, 75% y 100%, siendo un total de 16 muestras por cada concentración, dando un total de 58 muestras. Las mediciones de sus halos de inhibición fueron en dos momentos, uno a las 24 horas, y el último, a las 48 hrs, utilizando como grupo control positivo a la Clorhexidina al 0.12%, y como control negativo, agua destilada.

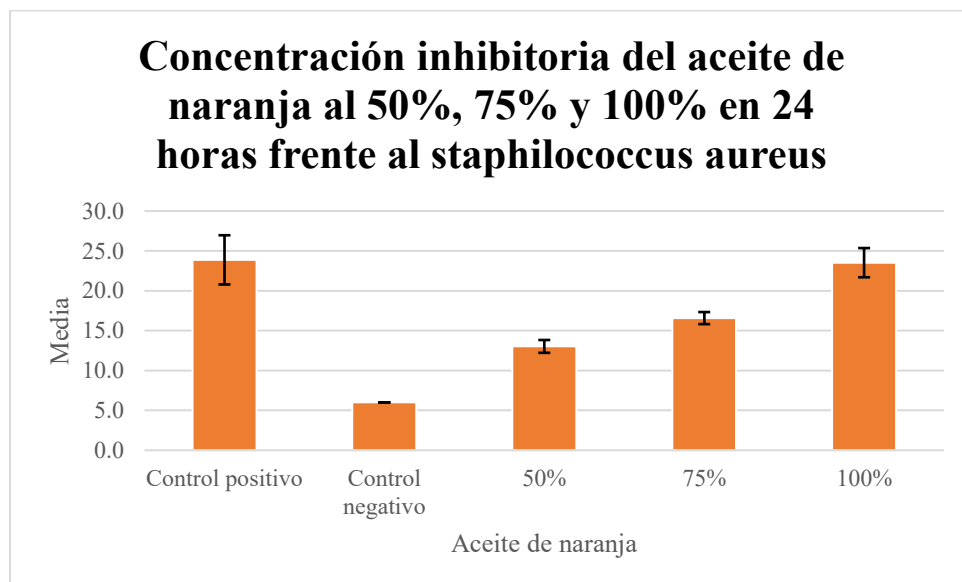
**Tabla 1**

*Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x sinensis (naranja) al 50%, 75% y 100% en 24 horas frente al Staphilococcus aureus cepa ATCC 25923*

<b>Aceite de Naranja a las 24 h</b>					
<b>Concentración</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>Control negativo</b>	16	6.0	0.0	6.0	6.0
<b>Control positivo</b>	16	23.9	3.1	19.3	27.5
<b>50%</b>	16	13.0	0.8	11.3	14.2
<b>75%</b>	16	16.6	0.8	15.5	18.4
<b>100%</b>	16	22.1	1.8	19.4	24.9

**Figura 1**

*Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x sinensis (naranja) al 50%, 75% y 100% en 24 horas frente al Staphylococcus aureus cepa ATCC 25923*



*Nota.* A las 24 horas de exposición, el control negativo presentó una media de 6.0 mm; en contraste, el control positivo alcanzó una media de 23.9 mm con una desviación estándar de 3.1 mm. Respecto al aceite de naranja, se observó que a mayor concentración la media del halo de inhibición aumentó, siendo 13.0 mm al 50%, 16.6 mm al 75% y 23.5 mm al 100%.

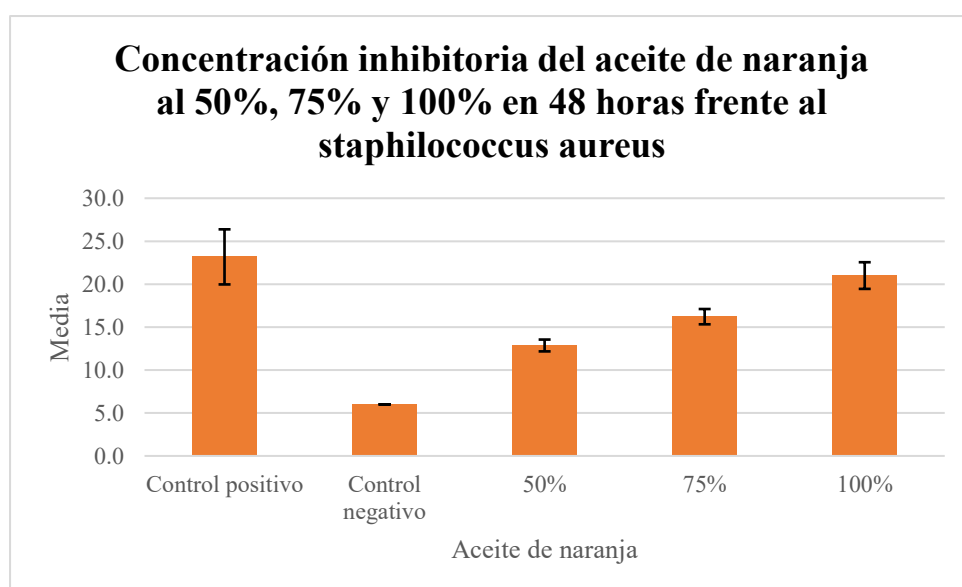
**Tabla 2**

*Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x sinensis (naranja) al 50%, 75% y 100% en 48 horas frente al Staphilococcus aureus cepa ATCC 25923*

<b>Aceite de Naranja a las 48 h</b>					
<b>Concentración</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>Control negativo</b>	16	6.0	0.0	6.0	6.0
<b>Control positivo</b>	16	23.2	3.2	18.2	26.9
<b>50%</b>	16	12.9	0.7	11.4	14.0
<b>75%</b>	16	16.2	0.9	14.7	18.5
<b>100%</b>	16	21.0	1.6	18.3	24.1

**Figura 2**

*Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x sinensis (naranja) al 50%, 75% y 100% en 48 horas frente al Staphilococcus aureus cepa ATCC 25923.*



*Nota.* A las 48 horas de exposición, el control negativo presentó una media de 6.0 mm; mientras que el control positivo una media de 23.2 mm con una desviación estándar de 3.2 mm. Respecto al aceite de naranja, se observó que a mayor concentración la media del halo de inhibición aumentó, siendo 12.9 mm al 50%, 16.2 mm al 75% y 21.0 mm al 100%.

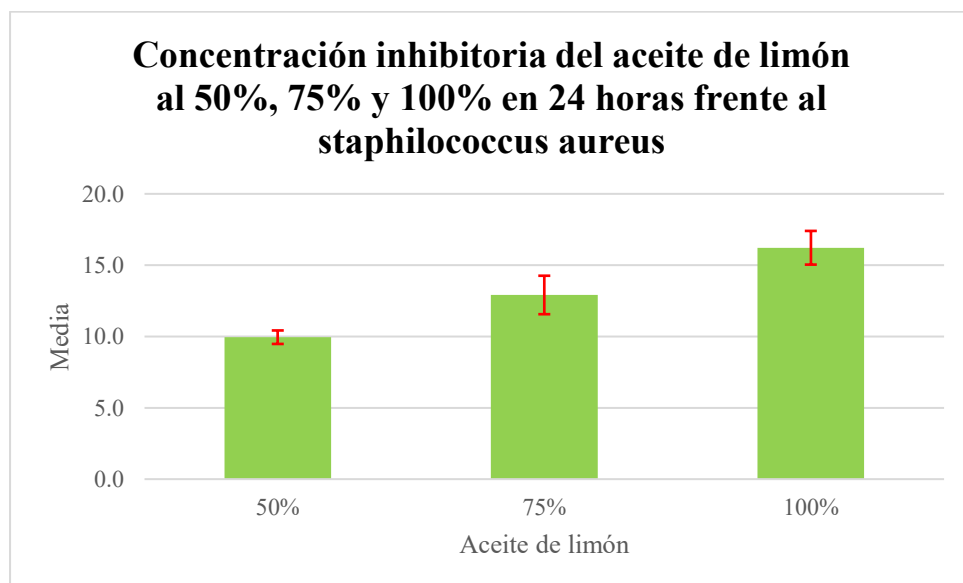
**Tabla 3**

*Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x limón (limón) al 50%, 75% y 100% en 24 horas frente al Staphilococcus aureus cepa ATCC 25923*

<b>Aceite de Limón a las 24 h</b>					
<b>Concentración</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>50%</b>	16	10.0	0.5	9.2	10.9
<b>75%</b>	16	12.9	1.3	11.0	15.3
<b>100%</b>	16	16.2	1.2	14.4	18.9

**Figura 3**

*Concentración inhibitoria de la cascara de citrus x limón (limón) al 50%, 75% y 100% en 24 horas frente al Staphilococcus aureus cepa ATCC 25923*



*Nota.* A las 24 horas, el aceite de limón al 50% mostró una media del halo inhibitorio de 10.0 mm con una desviación estándar de 0.5 mm, mientras que al 75% se observó una media de 12.9 mm con una desviación estándar de 1.3 mm y al 100% una media de 16.2 mm con una desviación estándar de 1.2 mm., se observa ligero incremento a mayor concentración.

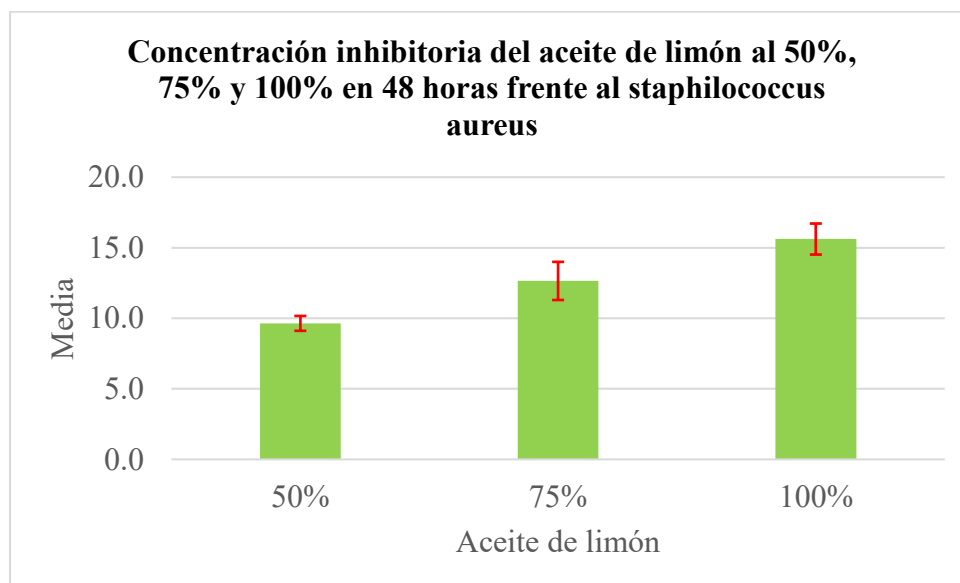
**Tabla 4**

*Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x limón (limón) al 50%, 75% y 100% en 48 horas frente al Staphilococcus aureus cepa ATCC 25923*

<b>Aceite de Limón a las 48 h</b>					
<b>Concentración</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>50%</b>	16	9.6	0.5	8.9	10.7
<b>75%</b>	16	12.6	1.4	10.9	15.1
<b>100%</b>	16	15.6	1.1	13.7	17.3

**Figura 4**

*Concentración inhibitoria de la cáscara de citrus x limón (limón) al 50%, 75% y 100% en 48 horas frente al Staphilococcus aureus cepa ATCC 25923*



*Nota.* A las 48 horas, el aceite de limón al 50% mostró una media del halo inhibitorio de 9.6 mm con una desviación estándar de 0.5 mm, mientras que al 75% se observó una media de 12.6 mm con una desviación estándar de 1.4 mm y al 100% una media de 15.6 mm con una desviación estándar de 1.1 mm. Se observa un ligero incremento conforme se incrementa la concentración.

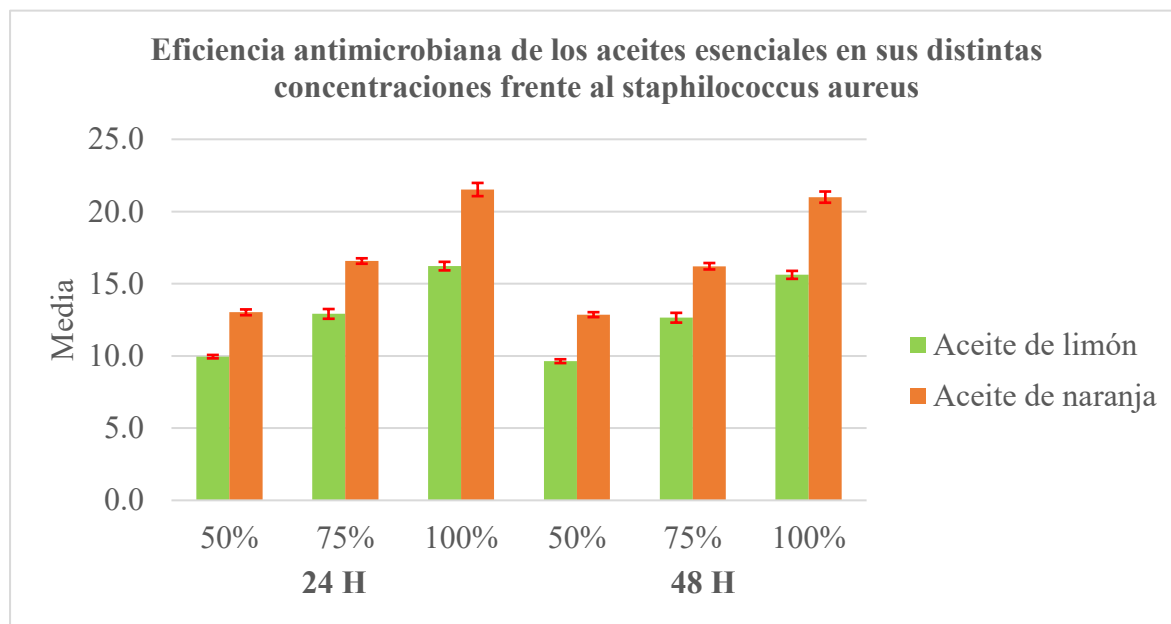
**Tabla 5**

*Comparación de los aceites esenciales en sus distintas concentraciones para evaluar su eficiencia antimicrobiana frente al Staphilococcus aureus cepa ATCC 25923*

Concentración	N	Aceite de limón		Aceite de naranja		P
		Media	E.E.	Media	E.E.	
<b>24 HORAS</b>						
50%	16	10.0	0.1	13.0	0.2	0.0001
75%	16	12.9	0.3	16.6	0.2	0.0001
100%	16	16.2	0.3	22.2	0.5	0.0001
<b>48 HORAS</b>						
50%	16	9.6	0.1	12.9	0.2	0.0001
75%	16	12.6	0.3	16.2	0.2	0.0001
100%	16	15.6	0.3	21.0	0.4	0.0001

### Figura 5

Comparación de los aceites esenciales en sus distintas concentraciones para evaluar su eficiencia antimicrobiana frente al *Staphilococcus aureus* cepa ATCC 25923



*Nota.* Al comparar el efecto antimicrobiano de ambos aceites a las 24 y 48 horas, se observó que en todas las concentraciones el efecto fue superior con el aceite de naranja mostrando valores promedio más altas del halo inhibitorio. Además, se encuentra que estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Esta investigación evaluó la efectividad de los aceites esenciales de citrus x sinensis y citrus limón a concentraciones de 50%, 75% y 100% frente a la cepa de *Staphilococcus aureus*, utilizando como grupo control a la clorhexidina al 0.12%.

Para Jiménez (2022) el género *Citrus* presenta grandes propiedad antioxidantes y antimicrobianas, ya que en su revisión sistémica nos demuestra la presencia metabolismos secundarios, los cuales son responsables de su poder plaguicida, antifúngico, antibacterianos, antiinflamatorios y antioxidantes. Todo esto gracias a la presencia de los bioflavonoides, como lo son el citral y el D-limoneno, los cuales degradan distintas estructuras de los microorganismo dañinos, como su membrana celular y pared, y propiedades bacteriostáticos y bactericidas también dadas por los fenoles, aldehídos y flavonoides, entre otros aceites esenciales, dejando en evidencia lo que esta investigación demostró a través de prueba de sensibilidad bacteriana realizada contra el *Staphilococcus aureus* para evaluar su eficacia antibacteriana, dando los mismo resultados que la revisión sistémica del Dr. Jiménez.

Por su parte, Sin (2021) y sus colaboradores, también encontraron propiedades similares en las pruebas realizadas a los aceites de naranja, limón, toronja y pomelo, contra distintos microorganismos, los cuales fueron *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, prevención de la formación de biopelícula dental, inhibiendo a la *Lactococcus lactis*, mostrando las mismas propiedades ya expuestas por los estudios realizados por Jiménez y esta investigación, aportando que usando estos metabolismos secundarios con ayuda de la biotecnología, se podrían agregar a productos orales como alternativa natural, sin alterar la microflora oral con productos netamente químicos.

Por otro lado, la investigación hecha por Ramirez (2019) puede ser algo controversial con los resultados, ya que resalta que las propiedades de dichos aceites, como su efecto inhibitorio, pueden variar, dependiendo de la zona geográfica, tiempo de cosecha, o

condiciones ambientales, tanto en bacterias gram positivas y gram negativas, también teniendo en cuenta el grado de maduración de la fruta, identificándola con el color que presentaba la cáscara. Adjudicándose también la primera investigación de la naranja dulce de origen mexicano. Exceptuando esto, los resultados de los aceites obtenidos hidroddestilación también mostraron efectos bacteriostáticos y antimicrobianos, usando como método de recopilación de datos, el barrido por espectrofotómetro, dando datos más exactos, disminuyendo notablemente el sesgo humano en la parte de laboratorio y toma de datos. Sacando como conclusión más notable junto a la investigación de Jimenez (2022), que el D- Limoneno fue el componente bioactivo con mayor índice de efecto antibacteriano frente a múltiples cepas bacterianas, como el *Streptococcus mutas*, el *Staphilococcus aureus*, *Staphilococcus epidermis*, *Enterococcus faecalis*, etc.

En cuanto al método, la Dra. Ramírez (2019), sugiere que el aceite esencial se obtenga a través del método de extracción sólido-líquido, también llamado destilación Soxhlet, ya que separa mejor los componentes orgánicos de la cáscara, y se obtiene mayor cantidad del aceite, con el inconveniente que requiere un mayor costo monetario, a comparación del método por hidroddestilación por medio del aparato de Clevenger, que otorga menor cantidad de aceite. En cuanto si existía o no propiedad antimicrobiana, sustenta que frente al *Staphylococcus aureus*, los aceites de naranja presentaron una sensibilidad intermedia frente a la destilación líquido-líquido, y una sensibilidad moderada frente al destilado por el método Soxhlet, coincidiendo con esta investigación respecto a los efectos presentados en los aceites esenciales. También, el compuesto orgánico con mayor presencia, también resulto ser el D-Limoneno, junto con otro más, el  $\beta$ -Mirceno, que también presento propiedad antimicrobianas y antioxidantes.

En conclusión, junto con los demás autores, se determinó que los aceites esenciales del género Citrus si presentan eficiencia antibacteriana frente a distintos microorganismos, como el *Staphylococcus aureus* usado en esta investigación, que los aceites esenciales obtenidos a

través del método de hidrodestilación, son también una buena elección para la obtención de las moléculas orgánicas responsable de sus efectos positivos, ubicadas en la cáscara de estas frutas, aumentando así la literatura científica respecto a la utilización de los residuos orgánicos reciclables, y aprovechar cada elemento de la fruta, y motivar a su utilización en distintos experimentos para beneficiar a la población , usándolo como componente en coadyuvantes de la salud oral, como colutorios o dentífricos.

## VI. CONCLUSIONES

6.1. Los resultados obtenidos por la prueba de sensibilidad del aceite esencial de *Citrus x sinensis* frente al *Staphylococcus aureus*, demostraron que su eficacia fue mayor en las primeras 24 horas, dando como media un valor de 22.1 mm para 100% de concentración,

6.2. Las muestras analizadas a las 48 hrs en el aceite esencial de *Citrus x sinensis*, nos dio una media de 21 mm, viéndose disminuida en 1.1 mm en comparación con la medición hecha a las 24 horas.

6.3. Respecto al aceite esencial de *Citrus limón*, el mayor halo inhibitorio se mostró a las 24 hrs, mostrando un halo de 16.2 mm.

6.4. En comparación con el aceite de *Citrus limón* medido a las 24 horas, el halo medido a las 48 hrs, fue de 15.6 mm., concluyendo que, al igual que en el aceite de *Citrus x sinensis*, los mejores resultados se dieron a las 24 horas.

6.5. Ambos aceites demostraron poseer propiedades antibacterianas, ya que la prueba de estadística inferencial de T de Student, demostró que los resultados presentaban diferencias significativas.

6.6. El *Citrus x sinensis* demostró ser el aceite esencial con mayor efectividad bacteriana frente al *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923, con una media de 22.1 mm y una desviación estándar de 1.85 mm, acercándose a los valores del grupo control que fue la Clorhexidina al 0.12%, la cual obtuvo una media de 23.9 mm con una desviación estándar de 3.1 mm.

## VII. RECOMENDACIONES

7.1. Utilizar distintas cepas bacterianas, virus y hongos, para aumentar el conocimiento sobre las limitaciones y beneficios que presentan los aceites esenciales de *citrus x sinensis* y *citrus limón*.

7.2. Comparar más aceites esenciales de cáscaras del género Citrus, para medir sus efectos antibacterianos y diferentes propiedades beneficiosas.

7.3. Emplear otros productos químicos a parte del grupo control para comparar su eficiencia bactericida.

7.4. Separar las moléculas orgánicas más importantes como el Limoneno para obtener concentrados más puros y evaluar su eficacia antibacteriana netamente

7.5. Comparar distintos métodos de destilación para la obtención del aceite esencial y comparar cual posee mayor eficiencia respecto a su potencial frente a microorganismos.

### VIII. REFERENCIAS

- Anwar, T., Qureshi, H., Fatima, A., Sattar, K., Albasher, G., Kamal, A., Ayaz, A. & Zaman, W. (2023) *Citrus sinensis* Peel Oil Extraction and Evaluation as an Antibacterial and Antifungal Agent. *Microorganisms*, *Pub Med*, 11(7), 16-62.  
<https://www.mdpi.com/2076-2607/11/7/1662>
- Argote, V., Jimena, S., Tobar, D., Pérez, A., Hurtado, B. & Delgado, O. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en staphylococcus aureus y escherichia coli, *Rev. De la Facultad de Ciencias Agrarias*, 15(2), 54-68.  
<https://www.redalyc.org/pdf/3808/380878983007.pdf>
- Arweiler, N. & Netuschil, L. (2016). The oral microbiota. *Adv Exp Med Biol*, 902(1), 45- 60.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27161350/>
- Calderón, D. (2016). *Efecto del aceite esencial de Citrus limon sobre la viabilidad de Escherichia coli y Staphylococcus aureus in vitro* [Tesis de pos grado, Universidad Nacional de Trujillo] Repositorio académico UNT.  
<https://dspace.unitru.edu.pe/items/44dfbc74-0018-4a33-8e6d-eebdcdf66db5>
- Capozzi, E., Mobili D. & Martínez, I. (2015). Portadores nasales de *S. aureus* en el personal de enfermería de un centro de salud del Estado Carabobo, Venezuela. *KASMER*, 4(2), 2-3.  
[https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0075-52222015000200006&script=sci\\_abstract](https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0075-52222015000200006&script=sci_abstract)
- Castañeda, A., Antonio, R., Esther, C., Ricardo, M., Roberto, P. & Jesús, M. (2018). Actividad antimicrobiana del aceite de naranja residual, *Rev UNED Research Journal*, 10 (2), 469-474. <https://doi.org/10.22458/urj.v10i2.2175>
- Clemente, Y., Baksh, Y. & Seaforth, C. (2015) Un estudio etnobotánico de plantas medicinales en Trinidad. *J. Etnobiol. etnificado*, 11(1), 1–28.  
<https://ethnobiomed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13002-015-0052-0>

- Cruz, M., Díaz, P., Arias, D. & Mazón, M. (2017). Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. *Revista Cubana de Estomatología*, 54(1), 84-99. <https://revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/1323>
- Davis, C. (2008) Effects of Commonly Used Topical Antimicrobial Agents on *Acinetobacter baumannii*: An In Vitro Study. *Military Medicine*, 173(1), 74–7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18251335/>
- Domínguez, M. (2016). Flavonoides extraídos de la cascara de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal sachá inchi (*Plukenetia volubilis*). *Scientia Agropecuaria*, 7(4), 419- 431. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2077-99172016000500007&script=sci\\_abstract&tlng=en](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2077-99172016000500007&script=sci_abstract&tlng=en)
- Echegaray, R., Echegaray, G., Mosquera F. & Gerrikaetxebarria, P. (2017). Fitoterapia y sus aplicaciones. *Revista española de podología*, 6(1), 258-267. <https://www.revesppod.com/Documentos/ArticulosNew/X0210123811501573.pdf>
- Espejo, J., Rodríguez, K., Rodríguez, M. & Gómez, R. (2019) Identificación genotípica de *Staphylococcus* con fenotipo meticilino resistente aislados de muestras de humanos, animales y ambiente. *Rev. investig. Vet.*, 30(1), 364-376. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172019000100037&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172019000100037&script=sci_abstract)
- Favela, J., González, O., Ramírez, A., Esquivel, P. & Camacho, M. (2016) Chemistry and Pharmacology of *Citrus sinensis*, 6, 45-55. <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/2/247>
- Fiehn, N. & Tove, L. (2017) Infecciones por biopelícula dental: una actualización, *Rev AMIS*, 25, 376-384. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28407420/>
- Jiménez, J., Zamora, G., Campoverde, M. & Mariscal, S. (2022). Actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi* y *Citrus reticulata*.

RECIAMUC, 6(3), 399-407.

<https://reciamuc.com/index.php/RECIAMUC/article/view/921>

Klimek, M., Szopa, A. & Ekiert, H. (2020) *Citrus limón* (Limón) Fenómeno: una revisión de la química, las propiedades farmacológicas, las aplicaciones en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética moderna y los estudios biotecnológicos. *Rev. Plantas*, 9, 1-119. <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/1/119>

Lanzos, H. (2016). *Manejo de las complicaciones orales por tratamiento radioterápico: ensayo clínico aleatorizado y análisis crítico*. [Tesis de posgrado, Universidad Complutense de Madrid] Repositorio UCM. <https://docta.ucm.es/entities/publication/865b2e6d-ae43-4895-b290-46fddf5eb209>

León, M., Espriella, M., Granados, C., León, M. & Gonzales, F. (2024) Desarrollo de un soporte impregnado antibacteriano usando como activo aceite esencial de *Citrus sinensis*. *Revista cubana de farmacia*, 57(1), 1-12. <https://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/989>

Luque, L. (2021). *Actividad antioxidante y efecto antibacteriano del aceite esencial de cáscaras de citrus sinensis variedad valencia late* [tesis de pregrado, Universidad Norbert Wiener] Repositorio UNW. [https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UWIE\\_814db8d3ed28085a18b82fc30dc29d54](https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UWIE_814db8d3ed28085a18b82fc30dc29d54)

Luque, S. (2017). *Manejo odontopediátrico de la mucositis en pacientes intra y extra hospitalarios del Hospital de Niño "Dr. Ovidio aliaga*. [Tesis de grado, Universidad Mayor de San Andrés]. <https://repositorio.umsa.bo/xmlui/bitstream/handle/123456789/24216/TE-36.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Marsh, P., Beighton, D. & Devine, A. (2016) Influencia de la saliva en la microbiota bucal. *Periodoncia*

- 2000, 70, 80 – 92. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26662484/>
- Meccatti, V., Ribeiro, M. & Oliveira, L. (2022). Los beneficios de la fitoterapia en Odontología. *Investigación, Sociedad y Desarrollo*, 11 (3), 11-25. [https://www.researchgate.net/publication/359054363\\_Os\\_beneficios\\_da\\_fitoterapia\\_n\\_a\\_Odontologia](https://www.researchgate.net/publication/359054363_Os_beneficios_da_fitoterapia_n_a_Odontologia)
- Mobili, D., Falcon, D & Rodriguez, M. (2017) Staphylococcus spp. en bolsas periodontales de un grupo de pacientes que acuden a un Centro Odontológico del Municipio San Diego, Estado Carabobo. *Rev. KASMER*, 45(1), 16-23. <https://www.redalyc.org/journal/3730/373061522003/html/>
- Nordarse, R. (2009) Determinación del poder bactericida de la crema de vancomicina al 0,5 % frente a Staphylococcus aureus. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 38(3), 73-78. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-65572009000300008&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-65572009000300008&script=sci_abstract&tlng=es)
- Ramírez, P., Rosales, V., Escalante, V., Espíritu, G., Martínez, S., Marina, I. & Molina, G. (2019) Efecto inhibitorio de los aceites esenciales de Citrus sinensis sobre Streptococcus mutans y Staphylococcus epidermidis, *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, 5(5), 686-692. <https://zaloamati.azc.uam.mx/server/api/core/bitstreams/1cf12c16-98ca-494d-98ce-93d06a032b5c/content>
- Santos, S., Almeida, L., Sousa, C., Serra, B, Nogueira, S. & Guilhon, M. (2025) Potencial dos óleos essenciais cítricos como agentes antimicrobianos: uma revisão da literatura. *Revista Caderno Pedagogico*, 22 (2), 134-139. <https://ojs.studiespublicacoes.com.br/ojs/index.php/cadped/article/view/13439>
- Sarduy, L. & González, E. (2016). La biopelícula: una nueva concepción de la placa

dentobacteriana. *Medicentro Electrónica*, 20(3), 167-175.

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1029-30432016000300002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432016000300002)

Sin, C., Britos, M., Chamorro, E., Cáceres, M., Fernández, D. & Ortega, S. (2021). Aceites esenciales con actividad antibacteriana: posible aplicación y administración en odontología. *Rev. Odontología Vital*, 35(2), 32-43.

[https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1659-07752021000200032](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-07752021000200032)

Tupayachi, P. (2024) *Composición química y su efecto antimicrobiano del aceite esencial de citrus limón (l) osbeck sobre cepas de staphylococcus aureus, pseudomonas aeruginosa y escherichia coli*. [Tesis de pos grado, Universidad Nacional San Antonio Abad del Cuzco] Repositorio UNSAA.

<https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/8651?locale-attribute=es>

Winkelhoff, J., Rurenga, P., Wekema, J., Singadji, M. & Rams, E. (2016). Bastoncillos facultativos gramnegativos no orales en la microbiota de la periodontitis crónica. *Microbio patógeno*, 94 (1), 117 – 22. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26835659/>

## IX. ANEXOS

## 9.1 Anexo A

## 9.1.1. Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis	VARIABLES	Metodología
¿Cuál es la eficacia antibacteriana <i>in vitro</i> del aceite de la cáscara de <i>Citrus limón</i> (limón) y la cáscara de <i>Citrus x sinensis</i> (naranja) frente al <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923 <i>in vitro</i> ?	<p><b>Objetivo General</b> Comparar la efectividad antibacteriana del aceite esencial de la cáscara de <i>Citrus limón</i> (limón) y cáscara de <i>Citrus x sinensis</i> (naranja) frente al <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923 <i>in vitro</i>.</p> <p><b>Objetivos Específicos</b> Determinar la concentración inhibitoria de la cáscara de <i>Citrus x sinensis</i> (naranja) al 50%, 75% y 100 % en 24 hrs frente al <i>Staphylococcus aureus</i></p>	El aceite esencial de la cáscara de <i>Citrus limón</i> será menos efectivo que el aceite esencial de cáscara de <i>Citrus x sinensis</i> frente al <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923 <i>in vitro</i> .	<p>-Variable dependiente: Diámetro de halo de inhibitorio</p> <p>-Variable independiente: Agente microbiano (<i>Staphylococcus aureus</i>)</p> <p>-Covariable: Concentración del aceite de limón y la naranja</p>	<p><b>Tipo de investigación</b></p> <p><b>Población:</b> Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><b>Muestra:</b> <math display="block">n = \frac{2(1,96+0,842)^2(1,0)}{(1)^2}</math> N = 16</p>

	<p>cepa ATCC 25923.</p> <p>Determinar la concentración inhibitoria de la cáscara de <i>Citrus x sinensis</i> (naranja) al 50%, 75% y 100 % en 48 hrs frente al <i>Staphilococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.</p> <p>Determinar la concentración inhibitoria de la cáscara de <i>Citrus x limón</i> (limón) al 50%, 75% y 100 % en 24 hrs frente al <i>Staphilococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.</p> <p>Determinar la concentración inhibitoria de la cáscara de <i>Citrus x limón</i> (limón) al 50%,</p>			
--	--	--	--	--

	<p>75% y 100 % en 48 hrs frente al <i>Staphilococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.</p> <p>Comparar los aceites esenciales en sus distintas concentraciones para evaluar su eficiencia antimicrobiana frente al <i>Staphilococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.</p>			
--	--	--	--	--

**9.2. Anexo B****9.2.1. Ficha de recolección de datos**

<b>Muestras</b>	<b>Aceite esencial</b>			<b>Control positivo</b>	<b>Control negativo</b>
	<b>(Concentración)</b>				
	<b>50%</b>	<b>75%</b>	<b>100%</b>		
<b>1</b>					
<b>2</b>					
<b>3</b>					
<b>4</b>					
<b>5</b>					
<b>6</b>					
<b>7</b>					
<b>8</b>					
<b>9</b>					
<b>10</b>					
<b>11</b>					
<b>12</b>					
<b>13</b>					
<b>14</b>					
<b>15</b>					
<b>16</b>					

### 9.3. Anexo C

#### 9.3.1. Certificado de Agar Mueller Hinton

37762  
 Page 1 of 3



**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

<b>PRODUCT</b>	CM0337B MUELLER HINTON AGAR 500g	Delivery/Customer information Date Printed 2022.03.15 Delivery No.  Customer Customer Order Number
<b>LOT NUMBER</b>	3379958	
<b>EXPIRY DATE</b>	2026.10.20	
<b>DATE OF MANUFACTURE</b>	2021.10.22	

Physical Characteristics	Results	Specification
Appearance	Straw powder	Straw powder
Colour on reconstitution	Straw 2-3	Straw 2-3
pH (25°C)	7.2	7.2 - 7.4
Clarity	Clear	Clear

#### Microbiological Performance

Antibiotic susceptibility tests are performed in accordance to, and meet the acceptance limits of, the current ISO/TS 16782. Performance is assessed using EUCAST methodology.

*Staphylococcus aureus* ATCC®25923 WDCM00034  
Incubation at 35 ± 1°C for 16-20 hours in ambient air

	Zone Size (mm)	Limits (mm)
Erythromycin E15	27	22 - 30
Tetracycline TE30	28	24 - 30
Ciprofloxacin CIP5	24	22 - 30
Amoxicillin-clavulanate AMC30	34	28 - 36
Ampicillin-sulbactam SAM20	33	29 - 37
Linezolid LZD30	29	25 - 32
Cefoxitin FOX30	27	23 - 29
Gentamicin CN10	24	19 - 27
Penicillin P10	33	26 - 37

*Staphylococcus aureus* ATCC®29213 WDCM00131  
Incubation at 35 ± 1°C for 16-20 hours in ambient air

	Zone Size (mm)	Limits (mm)
Penicillin P1	14	12 - 18
Cefoxitin FOX30	28	24 - 30
Ciprofloxacin CIP5	22	21 - 27
Erythromycin E15	27	23 - 29
Gentamicin CN10	20	19 - 25
Linezolid LZD10	25	21 - 27
Tetracycline TE30	25	23 - 31



Tested by the Quality Control Laboratory  
**OXOID LIMITED**  
 Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 8PW, England  
 oxoid@thermofisher.com www.oxoid.com

## 9.4. Anexo D

### 9.4.1. Fotografías

#### A. Cáscara del limón



#### B. Extracción del aceite del limón



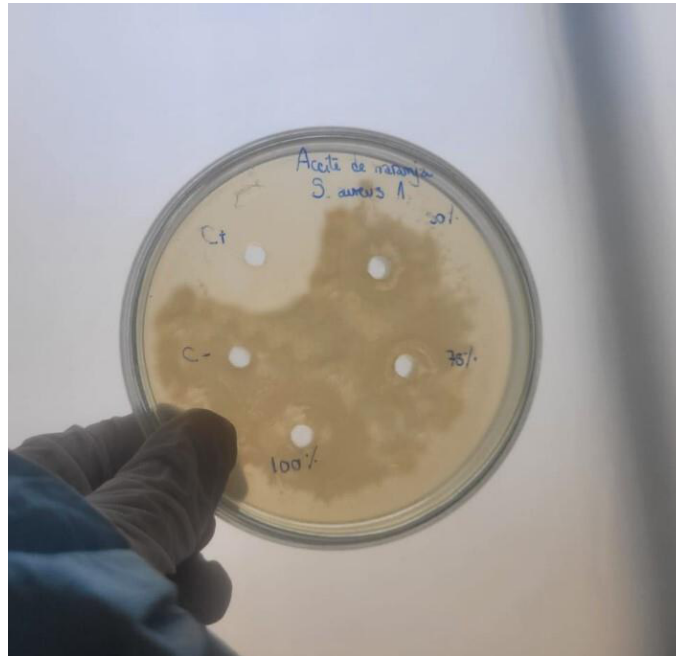
### C. Cáscara de la naranja



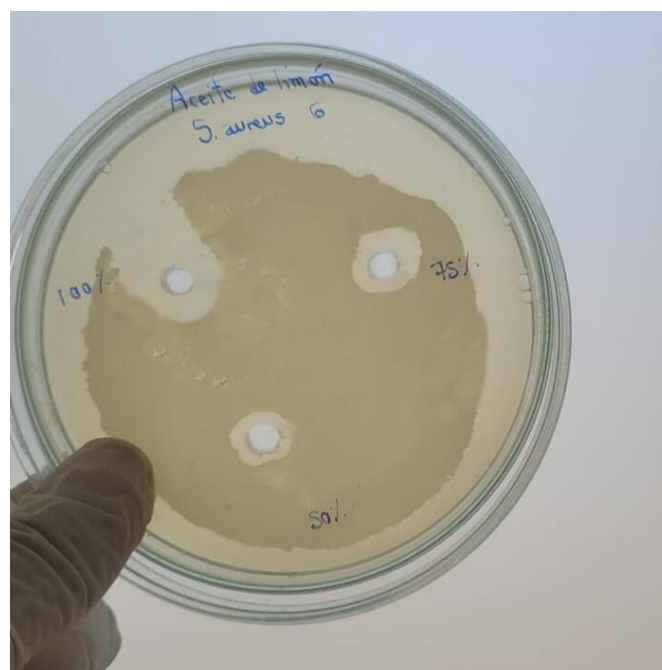
### D. Extracción del aceite de la naranja

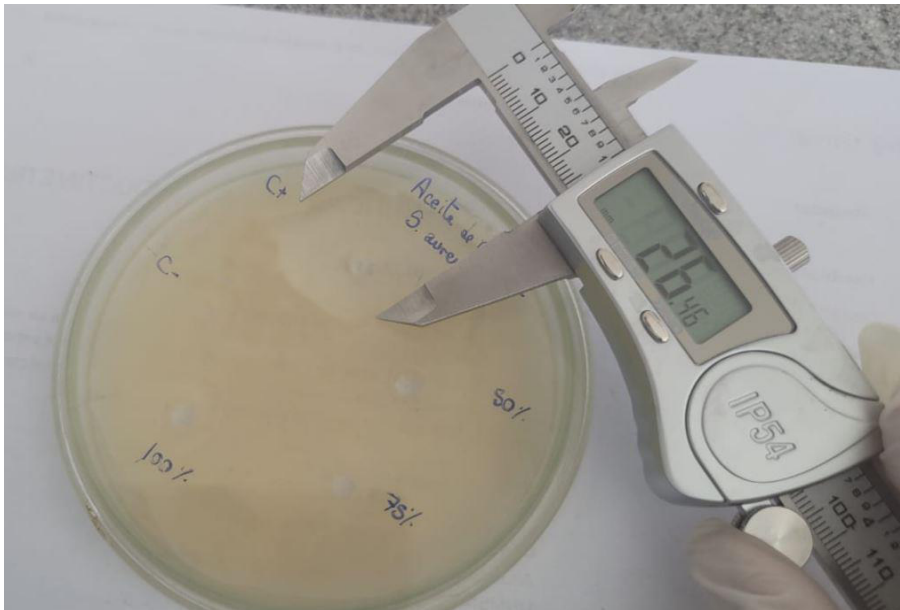


**E. Agar de *Staphylococcus aureus* inoculado con el aceite de naranja a concentraciones de 50%, 75% y 100%**



**F. Agar de *Staphylococcus aureus* inoculado con el aceite de limón a concentraciones de 50%, 75% y 100%**



**G. Halo de inhibición del grupo control (Clorhexidina 0.12%)**

## 9.5. Anexo E

## 9.5.1. Reporte de análisis



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
 Universidad del Perú. Decana de América  
 Facultad de Farmacia y Bioquímica  
 CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



## REPORTE DE ANÁLISIS N° 00024-CCA-2025

SOLICITADO POR\* : GRECIA GUELIETTA LUNA CANALES  
 DIRECCIÓN\* : AV. TOMÁS VALLE 1800  
 MUESTRA\* : ACEITE DE LIMÓN  
 DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO RECEPCIONADO : 01 frasco de vidrio ámbar con tapa rosca blanca y rotulado a mano.  
 VARIEDAD RECEPCIONADA\* : -  
 PRINCIPIO ACTIVO\* : - N° CAS\*: -  
 NÚMERO DE LOTE\* : -  
 CANTIDAD : 2 mL  
 ORDEN DE ANÁLISIS : 0014-2025  
 FECHA DE RECEPCIÓN : 12 de marzo del 2025  
 FECHA DE FABRICACIÓN\* : -  
 FECHA DE VENCIMIENTO\* : -  
 EJECUCIÓN DEL ENSAYO : Del 18 de marzo del 2025 al 28 de marzo del 2025  
 FECHA DE EMISIÓN : 08 de abril del 2025

EFICACIA ANTIMICROBIANA			
MICROORGANISMO	ACEITE DE LIMÓN		
	HALOS DE INHIBICIÓN (mm) - 24 horas		
	100%	75%	50%
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	15.73	11.50	09.23
	16.92	14.28	09.96
	17.33	11.02	10.00
	14.39	11.87	09.46
	16.50	13.53	10.84
	17.19	12.30	09.82
	16.33	13.99	09.79
	14.79	11.88	09.94
	18.88	15.27	09.43
	16.90	14.93	10.12
	14.66	11.77	09.94
	16.87	12.01	09.88
	15.76	11.48	09.49
	15.09	14.17	10.61
	15.54	13.49	09.86
16.65	13.10	10.85	



*[Firma manuscrita]*  
 08/04/2025



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
 Universidad del Perú. Decana de América  
 Facultad de Farmacia y Bioquímica



EFICACIA ANTIMICROBIANA			
MICROORGANISMO	ACEITE DE LIMÓN		
	HALOS DE INHIBICIÓN (mm) – 48 horas		
	100%	75%	50%
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	14.92	11.06	09.17
	15.22	14.03	09.95
	17.27	10.91	09.59
	14.04	11.59	09.41
	15.77	13.31	10.73
	17.11	12.22	09.46
	16.06	13.59	09.56
	13.72	11.65	09.46
	17.24	15.13	08.94
	16.23	14.64	10.05
	15.35	11.23	09.19
	16.43	11.87	09.30
	14.45	11.29	09.10
	14.72	13.89	10.41
	15.26	12.85	09.45
16.05	13.08	10.44	

\*Volumen inoculado: 30 uL.  
 \* Concentración del inóculo:  $1 \times 10^8$  UFC/mL

**Q.F. Paul Iván Gutiérrez Elescano**  
 Director del Centro de Control Analítico



\*Datos proporcionados por el cliente  
 Los resultados son válidos solo para la muestra ensayada.

9.6. Anexo F


9.6.1. Certificado de cepa bacteriana



Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p><b>SPECIFICATIONS:</b>  <b>Product Name:</b> Staphylococcus aureus subsp. aureus  <b>Catalog Number:</b> 0360  <b>Lot Number:</b> 360-661**  <b>Reference Number:</b> ATCC® 25923™**  <b>Passage from Reference:</b> 3  <b>Expiration Date:</b> 2026/07/31</p>	<p><b>RELEASE INFORMATION:</b>  <b>Quality Control Technologist:</b> Margaret E Wagener  <b>Release Date:</b> 2024/08/09</p>
---	--

Performance	
<p><b>Macroscopic Features:</b>                      Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic</p> <p><b>Microscopic Features:</b>                      Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters</p> <p><b>ID System:</b> MALDI-TOF (1)</p> <p>See attached ID System results document.</p> <p><b>Other Features/ Challenges: Results</b></p> <p>(1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive                      (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive                      (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative                      (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm                      (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm                      (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm</p>	<p><b>Medium:</b>                      SBAP</p> <p><b>Method:</b>                      Gram Stain (1)</p> <p style="text-align: right;">                       Amanda Kuperus                      Director of Quality Control                      AUTHORIZED SIGNATURE                 </p>

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.  
 (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.



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



# Lyophilized or Dried Biological Material Preparations



## Safety Data Sheet

### SECTION 1: Identification

#### 1.1. Product identifier

Product name	: Lyophilized or Dried Biological Material Preparations
Product synonym	: Charcoal and non-charcoal based Microorganism Products
Trade names	: KWIK-STIK™ KWIK-STIK™ Plus LYFO-DISK™ Epower™ Epower™ CRM EZ-CFU™ EZ-CFU™ One Step EZ-PEC™ EZ-SPORE™ Lab-Elite™ CRM EZ-Accu Shot™ EZ-Accu Shot™ Select EZ-Accu Shot™ Selective Media EZ-Accu Shot™ Starved Cells

#### 1.2. Recommended use and restrictions on use

Used for microbiological quality control.

#### 1.3. Supplier

Microbiologics, Inc.  
200 Cooper Avenue North  
Saint Cloud, MN 5630  
+1.320.253.1640

#### 1.4. Emergency telephone number

24 hour Emergency Number: United States: +1.866.928.0789 or +1.215-207-0061 (Carechem)  
Canada: +1.800.579.7421 or +1.202.464.2554 (Carechem)

### SECTION 2: Hazard identification

#### 2.1. Classification of the substance or mixture

Classification (GHS-CAN/US)

Not classified

#### 2.2. GHS Label elements, including precautionary statements

GHS-CAN/US labeling

No labeling applicable

#### 2.3. Other hazards

No additional information available

#### 2.4. Unknown acute toxicity (GHS-CA)

No data available

### SECTION 3: Composition/Information on ingredients

#### 3.1. Substances

Not applicable

#### 3.2. Mixtures

Name	Product identifier	%	GHS-CAN Classification	GHS-US classification
Gelatin	(CAS No) 9000-70-8	5 - 60	Not classified	Not classified
Sucrose	(CAS No) 57-50-1	0 - 60	Not classified	Not classified
Glucose	(CAS No) 50-99-7	0 - 60	Not classified	Not classified
Phosphoric acid, potassium salt (1:1)	(CAS No) 7778-77-0	5 - 35	Not classified	Not classified
Albumins, blood serum	(CAS No) 9048-46-8	10 - 30	Not classified	Not classified
Skim milk (Bovine - USA origin)	None	2 - 20	Not classified	Not classified

Q.F. VICTORIA CONTRERAS LLAMOCCA  
C.I.F.P. 00044  
DIRECTOR TÉCNICO  
GenLab  
del Perú