

## AUTORIZACIÓN Y DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, ALINDA KUSTA ESPINOZA RAMOS, con DNI 44878223, en mi condición de autor(a) de la tesis/ trabajo de investigación/ trabajo académico presentada para optar el Título Profesional de “Químico Farmacéutico”, AUTORIZO a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para reproducir y publicar de manera permanente e indefinida en su repositorio institucional, bajo la modalidad de acceso abierto, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Asimismo, DECLARO BAJO JURAMENTO<sup>1</sup> que dicho documento es ORIGINAL con un porcentaje de similitud de 16 % y que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

En señal de conformidad con lo autorizado y declarado, firmo el presente documento a los 03 días del mes de noviembre del año 2022.

---

ALINDA KUSTA ESPINOZA RAMOS  
44878223

---

Asesor de tesis  
45276376

---

<sup>1</sup> Se emite la presente declaración en virtud de lo dispuesto en el artículo 8°, numeral 8.2, tercer párrafo, del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos conducentes a Grados y Títulos - RENATI, aprobado mediante Resolución de Consejo Directivo N° 033-2016-SUNEDU/CD, modificado por Resolución de Consejo Directivo N° 174-2019-SUNEDU/CD y Resolución de Consejo Directivo N° 084-2022-SUNEDU/CD.

## AUTORIZACIÓN Y DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, MILAGROS DESIRÉ HUIÑAC SAAVEDRA, con DNI 47588117, en mi condición de autor(a) de la tesis/ trabajo de investigación/ trabajo académico presentada para optar el Título Profesional de "Químico Farmacéutico", AUTORIZO a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para reproducir y publicar de manera permanente e indefinida en su repositorio institucional, bajo la modalidad de acceso abierto, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Asimismo, DECLARO BAJO JURAMENTO<sup>2</sup> que dicho documento es ORIGINAL con un porcentaje de similitud de 16 % y que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

En señal de conformidad con lo autorizado y declarado, firmo el presente documento a los 03 días del mes de noviembre del año 2022.



---

MILAGROS DESIRÉ HUIÑAC SAAVEDRA  
47588117



---

Asesor de tesis  
45276376

---

<sup>2</sup> Se emite la presente declaración en virtud de lo dispuesto en el artículo 8°, numeral 8.2, tercer párrafo, del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos conducentes a Grados y Títulos - RENATI, aprobado mediante Resolución de Consejo Directivo N° 033-2016-SUNEDU/CD, modificado por Resolución de Consejo Directivo N° 174-2019-SUNEDU/CD y Resolución de Consejo Directivo N° 084-2022-SUNEDU/CD.

# APlagio TESIS UMA (ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE CITRUS X LIMON)

## INFORME DE ORIGINALIDAD



## FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>repositorio.uigv.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>7%</b>
<b>2</b>	<b>intra.uigv.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>4%</b>
<b>3</b>	<b>repositorio.uladech.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>4</b>	<b>repositorio.uma.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>5</b>	<b>repositorio.upao.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>

Excluir citas  Activo  
Excluir bibliografía  Activo

Excluir coincidencias  < 1%



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

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO  
DE LA CASCARA DE *Citrus x limon* (LIMÓN) FRENTE A  
*Cutibacterium acnes* ATCC 6919 IN VITRO**

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

**AUTORES:**

Bach. ESPINOZA RAMOS, ALINDA KUSTA

<https://orcid.org/0000-0003-1398-0629>

Bach. HUIÑAC SAAVEDRA, MILAGROS DESIRE

<https://orcid.org/0000-0003-1322-4495>

**ASESOR:**

Mg. FLORES LÓPEZ, OSCAR BERNUY

<https://orcid.org/0000-0001-9091-2537>

**LIMA – PERÚ  
2021**

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo lo dedico en especial a Dios, por ser el inspirador y darme esa fuerza para continuar con este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados y a la vez a mis padres por motivarme siempre.

Bach. ALINDA KUSTA ESPINOZA RAMOS

Agradezco a Dios, por darme las fuerzas necesarias para seguir con mis metas. En especial a mis padres, por el gran ejemplo de perseverancia y apoyo incondicional; a mi madre, compañera de una y mil aventuras, por estar siempre a mi lado alentándome para lograr mis propósitos de todo esfuerzo y al gran amor de mi vida, mi hija Camila.

Bach. MILAGROS DESIRE HUIÑAC SAAVEDRA

## **AGRADECIMIENTO**

A nuestro creador, que nos bendice cada día, fortalece nuestro espíritu e ilumina nuestro camino para lograr nuestros anhelos.

A las autoridades de nuestra Alma Mater, la Universidad María Auxiliadora, por el interés de brindarnos la mejor formación académica.

A todos nuestros maestros por compartir con nosotros sus conocimientos y experiencias profesionales.

A todos los que de una u otra manera contribuyeron en nuestro desarrollo personal y profesional.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	10
ABSTRACT .....	11
I. INTRODUCCIÓN .....	12
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1. Tipo de investigación.....	27
2.2. Nivel de investigación.....	27
2.3. Diseño de la investigación.....	27
2.4. Área de estudio .....	27
2.5. Población y muestra Población.....	28
III. RESULTADOS .....	50
IV. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....	76
IV. CONCLUSIONES.....	79
V. RECOMENDACIONES.....	80
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	81
Anexo 1. MATRIZ DE CONSISTENCIA.....	85
Anexo 2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA .....	86
Anexo 3. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE CUTIBACTERIUN ACNES .....	87

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Operacionalización de variables.....	30
Tabla 2	Ensayo de solubilidad del extracto etanolico de la cascara <i>citrus x limon</i> .....	51
Tabla 3	Ensayo Fitoquímico preliminar del extracto etanolico de la cascara de <i>Citrus x limon</i> (Limón) .....	53
Tabla 4	Evaluación de la actividad de <i>Citrus x limon</i> in vitro .....	54
Tabla 5	Lectura de porcentaje de actividad antibacteriana del extracto, sobre <i>Cutibacterium acnes</i> a las 24, 48 y 72 horas.....	55
Tabla 6	Lectura de formación de halos de inhibición según el porcentaje de efectividad de la concentración del extracto etanolico de <i>Citrus x limon</i> .....	58
Tabla 7	Porcentaje de inhibición del extracto etanolico de <i>Citrus x limon</i> según concentración. (Expresados en %).....	60
Tabla 8	Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad entre los halos de inhibición por extracto etanolico de <i>Citrus x limon</i> sobre cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> a las 24h .....	61
Tabla 9	Análisis de la varianza (ANOVA) de la actividad entre los halos de inhibición por extracto etanolico de <i>Citrus x limon</i> sobre cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> a las 48h .....	62
Tabla 10	Análisis de la varianza (ANOVA) de los actividades entre los halos de inhibición por extracto etanolico de <i>Citrus x limon</i> sobre cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> a las 72h .....	64

Tabla 11	A las 24 h, se comparó posteriormente la actividad inhibidora del extracto etanólico de <i>Citrus x limon</i> (Limón) sobre el cultivo de <i>Cutibacterium acnes</i> y comparaciones múltiples (ANOVA). .....	67
Tabla 12	Comparación post-hoc y comparación múltiple (ANOVA) de la actividad del extracto etanólico de cítrico x limón en el halo inhibidor. <i>Cutibacterium acnes</i> cultivado durante 48 horas.....	69
Tabla 13	Comparación post-hoc y comparación múltiple (ANOVA) de la actividad haloinhibidora del extracto de etanol <i>Citrus x limon</i> (Limón) en el cultivo de <i>C. acnes</i> a las 72 h.....	72
Tabla 14	Sistematización taxonómica del Limón.....	90

## INDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1	Prueba de Solubilidad .....	38
Cuadro N° 2	Prueba de Carbohidratos .....	39
Cuadro N° 3	Prueba de Flavonoides .....	40
Cuadro N° 4	Prueba para Compuestos Fenólicos.....	41
Cuadro N° 5	Prueba para Cumarinas .....	41
Cuadro N° 6	Prueba para Taninos.....	43
Cuadro N° 7	Prueba de Alcaloides .....	43
Cuadro N° 8	Prueba de Aminoácidos .....	45
Cuadro N° 9	Prueba de Saponinas.....	45
Cuadro N° 10	Fórmula del Porcentaje de Actividad Inhibitorio Relativo (PEIR) .....	49
Cuadro N° 11	Clasificación Actividad Antibacteriana según Porcentaje de inhibición .....	50

## INDICE DE GRAFICOS

- Gráfico N° 1 Porcentaje de actividad inhibitorio relativo de la Tetraciclina vs. El extracto etanolico al 100% y 75 % ..... 58
- Gráfico N° 2 Basado en la concentración de extracto de etanol *Citrus x limon* al 75% y 100% para comparar el porcentaje efectivo de tetraciclina a las 24, 48 y 72 horas para leer la inhibición de la formación de halo ..... **¡Error! Marcador no definido.**

## INDICE DE FOTOS

FOTO N° 1	Preparación del extracto etanolico de <i>Citrus x limon</i> .....	91
FOTO N° 2	Obtención del extracto etanolico de <i>Citrus x limon</i> .....	92
FOTO N° 3	Prueba de solubilidad.....	92
FOTO N° 4	Tamizaje Fitoquímico, identificación de metabolitos secundarios.....	93
FOTO N° 5	Preparación del estándar (0,5 mc. farland) para el inóculo.....	94
FOTO N° 6	Preparación del agar Mueller Hinton.....	94
FOTO N° 7	Siembra de la cepa <i>Cutibacterium acnes</i> y Aplicación de los discos .....	95
FOTO N° 8	Halos de inhibición del extracto etanólico de <i>Citrus x limon</i> (Limón) .....	97

## RESUMEN

La resistencia bacteriana es una problemática mundial de la salud, alarga tratamientos e incrementan costos que muchos pacientes no tienen capacidad de afrontar; esto genera la necesidad de utilizar plantas medicinales como fuente de compuestos importantes y considerarlo como una alternativa terapéutica para reducir la resistencia bacteriana. **Objetivo:** Determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus x limon* (Limón) frente a la cepa de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919. **Metodología:** Nuestra investigación tiene un enfoque Cuantitativo, de diseño metodológico Observacional, de corte Transversal. Fue evaluada mediante la técnica Kirby & Bauer, en concentraciones al 25, 50,75 y 100 % del extracto, se utilizó tetraciclina como control positivo y agua destilada estéril como control negativo. **Resultados:** Los resultados evidenciaron la actividad antibacteriana del extracto de la cascara del *Citrus x Limon* (Limon) a concentraciones de 75% y 100%, presentando halos de inhibición promedio de 16,31 mm y 47,96 mm respectivamente de efecto inhibitorio, tomando como referencia la tetraciclina que tienen 100% de efecto inhibitorio. **Conclusión:** De acuerdo a los resultados obtenidos, se determina que a concentraciones del 75% y 100% de extracto etanólico de la cascara de *citrus x limon*, presentaron halos de inhibición con efecto antibacteriano frente a *Cutibacterium acnés* ATCC 6919.

**Palabras clave:** *Citrus x limon*, *Cutibacterium acnes*, antibacteriana, halo de inhibición.

## ABSTRACT

Bacterial resistance is a global health problem, it lengthens treatments and increases costs that many patients do not have the capacity to face; This generates the need to use medicinal plants as a source of important compounds and consider it as a therapeutic alternative to reduce bacterial resistance. Objective: To determine the in vitro antibacterial effect of the ethanol extract of the *Citrus x limon* (Limón) peel against the *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 strain. Methodology: Our research has a quantitative approach, observational methodological design, cross-section. It was evaluated by means of the diffusion technique in nutritive agar using the Kirby technique. & Bauer, in concentrations of 25, 50 and 75% of the extract, with amoxicillin as a positive control and sterile distilled water as a negative control. Results: The results showed the antibacterial effect of the 75% Limon extract, presenting an average inhibition halo of 16.31mm. of inhibitory effect taking as reference tetracyclines that have 100% inhibitory effect and in concentration to 100% reports 47.96mm Analysis of Variance (ANOVA) of a factor, it was found that there is a significant difference between the treatments with a value of  $p < 0.05$ . Conclusion: The ethanol extract of the peel of *Citrus x limon* (Limón) at 75%, presenting average inhibition halos of 16.31 mm and in concentration at 100%, it reports 47.96 mm. It has an antibacterial effect against *Cutibacterium acnes* ATCC 6919.

Keywords: *Citrus x limon* (Limón), *Cutibacterium acnes*, antibacterial, inhibition halo

## I. INTRODUCCIÓN

Desde sus orígenes, el ser humano ha venido utilizando plantas tanto como parte de su dieta, como en el tratamiento de cualquier enfermedad o mal espiritual, así como para cuidar o prevenir cualquier enfermedad. Además, también dirigieron proyectos de investigación que, a lo largo del tiempo, coincidieron con los principios activos descubiertos en bioquímica. Este conocimiento de nuestros antepasados se desarrolló con el tiempo y se transmitió de generación en generación (1).

Por sus múltiples estratos ecológicos y ecosistemas, el Perú cuenta con una amplia variedad de riqueza natural, lo que nos permite tener una gran variedad de flora, de las cuales existen aproximadamente 20.000 especies vegetales, que representan el 8% del total de especies existentes. En la tierra, la gran mayoría de este recurso vegetal se puede ubicar en el Amazonas o en el este de Perú, de los cuales aún no han sido analizados en cuanto a características botánicas, y solo alrededor de 5,000 especies de plantas han sido identificadas por botánica. Entre los muchos tipos de plantas en el Perú, las plantas medicinales son uno de los recursos importantes del sistema de salud tradicional (1).

En la actualidad, la mayoría de la población que recibe atención en instituciones de salud, incluidos niños, adultos y ancianos, padece algún tipo de infección cutánea, que puede ser una señal de alerta del organismo o la causa de un determinado tipo de enfermedad, como a medida que la enfermedad se prolonga. En el curso de la infección causada por bacterias, la infección también está relacionada con muchas enfermedades (2).

Ante un gran número de infecciones cutáneas (acné) los casos relacionados con diferentes enfermedades y el consumo de fármacos convencionales es muy caro, se han demostrado importantes actividades adversas a nivel del sistema digestivo y del sistema nervioso central, y se anima a los pacientes a elegir los más económicos con menos productos naturales con actividades nocivas para la salud son plantas medicinales alternativas para el tratamiento de cualquier tipo de infecciones cutáneas (3)

Medicamentos, con propiedades fitoterapéuticas Efectivas para infecciones de la piel. Para lograr la actividad antibacteriana esperada sin causar riesgos para la salud, es necesario realizar estudios in vitro sobre las especies vegetales con diferentes bacterias frente a *Citrus x limon* (Limón), y consultar los datos farmacológicos de la planta (3). Son muchos los países a nivel mundial que padecen de enfermedades dérmicas, siendo la más común el acné. El Perú no es ajeno a esta enfermedad que es muy frecuente entre adolescentes de 13 a 18 años con una prevalencia de 80 – 85 por ciento, esta enfermedad puede afectar a nivel psicológico y social. Uno de los factores fisiopatológicos que desencadena el desarrollo del acné es la hipercolonización del folículo con *Cutibacterium acnes* (4) .

Al ser una enfermedad de la piel muy común en varios países en la actualidad, nos anima a estudiar una alternativa natural que pueda tratar y curar esta enfermedad y en el importante desarrollo de la industria farmacéutica, se busca innovar y utilizar nuevos fármacos en el tratamiento de la baja actividad indeseable, mejorando así el nivel de vida y la calidad de las personas. Como todos sabemos, nuestros antepasados usaban plantas para tratar y curar enfermedades basadas en la experiencia desde la antigüedad (5).

Las plantas medicinales siempre han sido una opción para la investigación de nuevas terapias alternativas. Más importante aún, debido a la ubicación geográfica de nuestro país, las plantas medicinales son abundantes, por eso decidimos estudiar los metabolitos secundarios en las plantas de citrus x limón. Antibióticos para tratar el acné. Por tanto, un fármaco botánico con menos actividad secundaria que los antibióticos convencionales (6).

La población mundial da mayor énfasis al consumo de producto naturales, la población peruana no es ajeno a ello ya que goza de una reconocida biodiversidad por sus climas y pisos ecológicos; a ello se agrega la flora, donde se encuentra gran variedad de plantas con uso medicinal, por la variedad de plantas que posee, el Perú se convierte en una fuente de investigación de interés permanente, en especial para el desarrollo de nuevas materias primas para el mercado farmacéutico, cosmético y alimenticio (7).

A pesar de contar con una elevada biodiversidad de plantas medicinales y complementadas con muchos saberes ancestrales relacionados con propiedades farmacológicas; sin embargo, hay escasez de información en el

país acerca de la actividad antibacterianas de las plantas con sustento científico (7).

Otro de los aspectos preocupantes observados es la autorización del uso de las plantas medicinales, pero no está integrada en el sistema de salud, ya que no se están aplicando una reglamentación de control de calidad, siendo el principal interés de la fitoterapéutica lograr la eficacia, seguridad y calidad de los fitofármacos (7).

También hay la necesidad de realizar estudios complementarios a las plantas conocidas con propiedades terapéuticas que abarquen desde análisis físico- químicos, la solubilidad, tamizajes fitoquímicos, ensayos microbiológicos que son necesarios para obtener un fitofármaco de calidad.

Es de suma importancia tener en consideración que mucha de las plantas medicinales contiene metabolitos secundarios, ya que existen falsas creencias que un tratamiento con plantas medicinales no presente actividades curativas, al igual que los medicamentos, siendo necesario realizar investigaciones para determinar su actividad antibacteriana frente a bacterias que pueda presentar actividad. Las plantas tienen en su composición metabolitos secundarios, dentro de los cuales los flavonoides poseen actividad antibacteriana.

Las bacterias afectan a gran parte de la población sin distinguir edad, sexo o raza, este fenómeno se da como una señal de alerta del organismo frente a un ataque externo o interno, o como causa de alguna enfermedad, La resistencia microbiana es causada por la evolución de las bacterias. “Aquellas bacterias que tengan una mutación que les permita sobrevivir se reproducirán”. Esto indica que las bacterias pasan por un proceso de mutación que al momento de reproducirse pasaran ese carácter genético a su sucesión, que será una procreación totalmente resistente (8).

Debido a que cada vez hay más incidencias de problemas antibacterianos que se relacionan con infecciones y otras patologías, esta información nos obliga a los farmacéuticos buscar nuevas alternativas naturales y más inocuas, por lo que se optó en investigar la actividad antibacteriana de la especie vegetal *Citrus x limon* (Limón).

Los objetivos alcanzados en el presente estudio sobre actividad antibacteriana de la especie *Citrus x limón* (Limón), va a contribuir como un potencial terapéutico alternativo con el respaldo y seguridad en su uso como

medicina alternativa.

Nos planteamos el siguiente objetivo general: Determinar actividad antibacteriana en el extracto etanólico de la cascara de *Citrus x limon* (Limón) frente a cultivos de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 (acné vulgaris), in vitro.

En la actualidad los medicamentos ya utilizados presentan casos de resistencia bacteriana y esto se debe al aumento de agentes patógenos resistentes, lo cual es una preocupación generalizada para la sociedad (3).

La finalidad de este trabajo de investigación es hacer de conocimiento que las plantas son muy importantes para la obtención de nuevos principios activos, lo cual hace que sea importante indagar sobre ellas y la actividad que puedan tener sobre las bacterias. Nuestro trabajo se fundamenta en la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cascara de *Citrus x limon* (Limón) en cultivos de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 (Acné vulgaris), in vitro, donde se quiere demostrar que la planta *Citrus x limon* es tan efectiva como el fármaco tetraciclina y que puede ser considerado como una opción alternativa para tratar la enfermedad del acné. Siendo su actividad antibacteriana una de las propiedades que se le atribuye al Limón, y esto se debe gracias a la presencia abundante de: Flavonoides, alcaloides, esteroides. Quito – Ecuador 2015 (9).

Se busca evidenciar la importancia del estudio fitoquímico de plantas medicinales, determinando así los metabolitos que presentan y aprovechar los beneficios que la naturaleza nos brinda, teniendo en cuenta que beneficiara a la población (23).

Este tipo de investigación se lleva a cabo utilizando modelos in vitro para obtener una mayor precisión de los resultados, lo cual es muy importante.

Las propiedades terapéuticas de las plantas se deben al contenido de sustancias químicas presentes en ellas, una o más de estas sustancias o principios activos son los responsables de las actividades farmacológicas. Algunas sustancias químicas con estructuras complejas han sido estudiadas, separadas, depuradas e incluso utilizadas como modelos para su síntesis, pero aún quedan muchas áreas por estudiar en este campo.

La investigación científica sobre especies de plantas ha mostrado propiedades terapéuticas, que incluyen propiedades antibacterianas,

antiinflamatorias y antioxidantes.

Pocos estudios o publicaciones nacionales o internacionales han demostrado que la actividad terapéutica se atribuya generalmente a plantas medicinales de la familia Rutaceae.

Los extractos de cáscara de *Citrus x limon* (Limón) se utilizan ampliamente en la prevención y el tratamiento de enfermedades, especialmente las causadas por microorganismos, y siguen siendo eficaces en la actualidad.

Como Antecedentes Nacionales tenemos a:

Tam Burga M. (2015). En su investigación titulada “Actividad inhibitorio in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus x limon* (Limón) sobre *Cutibacterium acnes* meticilino resistente”; Los autores en su investigación tuvieron como objetivo determinar la “Actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de cáscara de *Citrus x limon* (limón) sobre *Cutibacterium acnes* meticilino resistente y compararlo con la actividad antimicrobiana de vancomicina”, concluyendo el actividad inhibitorio in vitro del extracto etanólico de cáscara de *Citrus x limon* (Limón) sobre *Cutibacterium acnes* meticilino resistente. El extracto etanólico de cáscara de *Citrus x limon* se prepara en cuatro concentraciones: 5%, 25%, 50% y 75%. Además, se utilizó el método de Kirby– Bauer (difusión en disco). para evaluar la actividad antibacteriana del limón exponiéndolo a la meticilina *Cutibacterium acnes*, que es resistente a cuatro concentraciones de extracto de etanol. El estudio concluye que la Cáscara de *Citrus limon* (Limón) sí tiene actividad inhibitoria in vitro sobre *Cutibacterium acnes* meticilino resistente, pero es significativamente inferior al compararlo con vancomicina (10).

Según Estrada A. (2017), realizó una investigación denominada “Efectividad Antibacteriana in vitro del aceite esencial *Citrus Limon* en diferentes concentraciones sobre el *Streptococcus mutans*, Cusco, 2017”. En el estudio se utilizó diferentes concentraciones (50%, 75% y 100%) del aceite esencial Citrus limón sobre el *Streptococcus mutans*. Concluyendo que al utilizar el aceite esencial *Citrus limón* las concentraciones utilizadas al 75% y 100% muestran diferencias estadísticas con valores muy cercanos respecto a su actividad antibacteriano (11).

Según Pérez J. (2016), realizó una investigación denominada “Actividad

del agente antimicrobiano del aceite esencial de canela y aceite esencial de limón en la cobertura comestible y el tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras y aceptabilidad general en rodajas de banano (*Musa paradisiaca*)” resultado que el tratamiento de cobertura con aceite esencial de canela presentó el menor recuento de mohos y levaduras. La prueba de Mann-Whitney indicó que al día 4 de almacenamiento, la cobertura con aceite esencial de canela, fue el mejor debido a que presentó la mejor moda con puntos y fue diferente a los demás tratamientos (12).

Investigadores de diferentes partes del mundo han realizado estudios para verificar las actividades antibacterianas de las plantas medicinales.

Lizcano A. (2015) realizó una investigación denominada “Determinación de la actividad antibacteriana de tres variedades de limón (*Citrus limón* (L) osbeck, *Citrus limón* (L) osbeck en combinación con *Citrus reticulata* y *Citrus medica* L.) Frente a *Cutibacterium acnes* y *Escherichia coli*” en el presente trabajo se obtuvieron el aceite esencial y macerado de la hoja, cáscara y semilla de limón dando como resultado que frente a *Cutibacterium acnes* el aceite esencial y el macerado obtenido de hoja y cáscara de las tres variedades presenta actividad antibacteriana y no de la semilla frente a *Escherichia coli* (8).

Según Al-Aamri, (2018) Omán (Medio Oriente), realizó la siguiente investigación denominada “Composición química y actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* L. la cascara cultivadas en el este de Omán. El aceite esencial se aisló mediante hidrodestilación Se utilizó cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) para identificar y cuantificar los componentes químicos, donde se identificaron 33 compuestos químicos, con d-limóneno (63.35%) formando el componente principal. Otros componentes importantes incluyen 3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol (7,07%), geraniol (6,23%), E-citral (4,35%), Z-citral (3,29%) y  $\beta$ -ocimeno. (2,25%). El aceite esencial de la cascara de *Citrus aurantifolia* L. mostró una excelente actividad antibacteriana contra *Cutibacterium acnes* (13).

Jaramillo J., Barragan J. (2017) “Actividad de inhibición del extracto de Limón en concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% frente a *Streptococcus mutans* en 20 muestras in vitro, (2018)”<sup>10</sup>. El objetivo fue determinar el actividad inhibitorio que tenía el extracto de Limón en diferentes concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25% en cultivos de *Streptococcus mutans* utilizando 20 muestras en

intervalos de tiempo (24, 48 y 72 horas). La metodología es de carácter aplicada, longitudinal y comparativa, en la parte experimental se trabajó en 20 placas petri inoculadas con cepas de *Streptococcus mutans* y se realizó el método de Kirby – Bauer. Se obtuvo como resultado que el extracto de Limón con mayor actividad antibacteriana fue la concentración de 100% frente a la cepa de *Streptococcus mutans* presentando un halo de 10,4 mm en segunda instancia se consideró la concentración del 75% al presentar un halo que oscilaba entre 6,3 - 7 mm. No sucede lo mismo con las concentraciones del 25%, 50%, ya que arrojó como resultado actividad antibacteriana nula sobre el *Streptococcus mutans* (14).

La medicina tradicional es considerada por la OMS como “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 “, denominada medicina alternativa o complementaria (15).

Se ha utilizado a las plantas desde tiempos antiguos como parte de la medicina tradicional, teniendo una importancia a nivel mundial, ya que es el único modo de tratamiento accesible para personas de bajos recursos. La biodiversidad de plantas que existen en el mundo hace posible el tratar afecciones que aquejan a la humanidad. Dentro de las infecciosas más frecuentes encontramos a aquellas que son transmitidas por alimentos que afectan el tracto digestivo causando vómitos, dolor abdominal, diarreas y fiebre. Las infecciones bacterianas tienen como protagonista a diferentes bacterias entre ellas las enterobacterias como la *Escherichia coli*, bacteria que en los últimos tiempos vienen causando resistencia a fármacos que son utilizados como tratamiento de primera elección ante este tipo de infección (16).

En un comunicado de la OMS de febrero del 2017 la Dra. Marie-Paule Kieny señala: “La resistencia a los antibióticos va en aumento y estamos agotando muy deprisa las opciones terapéuticas., los nuevos antibióticos que con mayor urgencia necesitamos no estarán listos a tiempo”. Por eso es importante la creación de nuevos antibióticos que sean accesibles a la población utilizando a las plantas como parte de este proyecto.

El Perú es un país que posee gran variedad de plantas, que puede aportar beneficios a la sociedad tanto en el área económica como en el área de la ciencia, plantas como *Citrus x limon* que no necesita tantos cuidados para su desarrollo.

Por eso en este trabajo se propone darle mayor importancia a las plantas como parte del desarrollo de nuestro país (17).

La OMS considera a la medicina tradicional como “el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas “ (16).

Los objetivos alcanzados en el presente estudio sobre actividad antibacteriana de la especie *Citrus x limon* (Limón), va a contribuir como un potencial terapéutico alternativo con el respaldo y seguridad en su uso como medicina alternativa.

El limón (*Citrus x limon*) es una de las principales especies del género de los citrus, es un árbol pequeño con una altura de 3 a 6 metros.

Tienen piel roja joven. Flores solitarias o en racimos axilares, rojizos en estado de yema. Los pétalos son blancos en la parte superior y morados en la parte inferior. 20 a 40 estambres. Fruto alargado u ovalado, transparente o amarillo dorado, de piel más o menos gruesa y salpicado de glándulas, según la variedad. Jugo agrio y fragante. Semillas ovaladas y puntiagudas (18).

En términos generales, citrus x limón tiene muchas ramas, espinas duras y gruesas. Las ramas jóvenes con cuernos son más tarde redondas y lisas. La piel es uniformemente de color verde claro, de forma oblonga a ovalada, de 6 a 12,5 cm de largo y de 3 a 6 cm de ancho. Punta corta y roma. Los bordes están irregulares. Pecíolo corto y alas anchas (18).

La raíz es el órgano que se desarrolla primero después de que el embrión germina y luego se ramifica en situaciones posteriores para convertirse en un órgano más complejo. La raíz principal produce la tercera raíz secundaria, y así sucesivamente. Es vertical, tiene una estructura longitudinal gruesa y dura, y su color exterior es blanquecino o tiende al marrón. Con el desarrollo de nuevas raíces, tanto la raíz principal como la raíz primaria se suavizan, pierden su cabello absorbente y su función absorbente desaparece, convirtiéndose en un órgano conductor y de apoyo. Las principales funciones que realizan las raíces son: absorción, conducción, almacenamiento, fijación y respiración (18).

El tallo original es herbáceo y el color es verde, lo que afecta la función de la fotosíntesis. A medida que se desarrolla pierde esta característica y se vuelve leñosa, formando una forma generalmente única, casi cilíndrica, recta., Troncos y ramas muy variables de densos resistentes madera y flexible. La corteza es

lisa, blanquecina, las ramas extenderse hacia afuera y tienen espinas aisladas en las axilas del caparazón (18).

Cítrico x piel de limón es de dientes ovalados, pecíolo cortó, sin alas basales, pocas espinas, color verde pálido, glándulas oleaginosas esenciales en las hojas, aromáticas y muy volátiles, la cáscara mide 6-12,5 cm de largo y 3- 6 cm de ancho. Uniforme, fuerte, con un veteado evidente (18).

Las flores de este género de citrus son hermafroditas y de polinización cruzada o autopolinización, son grandes, aparecen en inflorescencias con rojo o violeta en el exterior y blanco en el interior. La flor tiene cinco pétalos (rara vez 4 o 6) de espesor y alargados en forma de cintas o cintas. Tiene muchos estambres (13-20), aunque suele haber 20-40 estambres múltiples, que se unen para formar unos haces cerca de la base; el ovario tiene 8-15 lóculos, el estilo es prominente y decidido, y el número de trompas contenido es el mismo que el mismo número de habitaciones (18).

Las semillas son de color blanco pajizo y están formadas por una protección externa exclusivamente llamada rebordear y una protección más interna compuesta por proteínas y embriones. El tegumento es la cubierta que rodea la semilla, mientras que la cubierta de la semilla o la envoltura exterior suele ser una estructura cortical dura de color blanco marfil o crema. Suele terminar con una punta plana. Está cubierto de moco, que puede retenerlo en la fruta y mantener la humedad necesaria. El tegmen está formado por una fina película que envuelve al embrión, su color varía de crema a morado y se oscurece en el extremo donde se ubica el frenillo (18).

Es una cáscara de naranja ovalada u oblonga con una sandía lisa o verrugosa al final, la piel es delicada y amarilla cuando está madura, está muy firmemente adherida a la pulpa y tiene muchas glándulas sebáceas que contienen aceites esenciales. La pulpa de color amarillo verdoso suele ser rica en ácido cítrico, lo que le da un sabor único. El interior del fruto se divide en tantas partes como células hay en el ovario. La pared ovárica se engrosa para formar exocarpio, mesocarpio y endocarpio. El exocarpio es grueso y blando, con muchas glándulas sebáceas esenciales. El mesocarpio suele ser esponjoso, fino y poco profundo, en el interior la piel es jugosa y constituye la mayor parte del fruto, se divide en muchas partes que se pueden separar fácilmente entre sí; En

su interior se encuentran los sacos de jugo, que se extienden de manera filamentosa desde la posición que ocupan hasta la parte más interna donde se encuentra la semilla (18).

#### - Taxonomía

La clasificación Nombres vulgares

Es una de las especies con un caparazón coriáceo grande. Tiene una espina al lado de su base, un borde fino en forma de abanico y muchos puntos brillantes. Cuando miras el caparazón a la luz, los pétalos suelen tener un exterior rosa claro y por dentro es de color blanco. El limón es de forma ovalada, algo alargada, con una sandía final, gruesa pero no rugosa, y de color amarillo azufre. La parte carnosa se divide en diferentes partes, muy ácida (19).

Principios activos

Los agentes antimicrobianos ayudan a reducir la mortalidad y previenen la propagación de enfermedades infecciosas. (20) Constituyen una gran clase de compuestos con estructuras diferentes y miles de mecanismos de acción, que pueden combatir bacterias, virus, hongos y parásitos. Se clasifican según criterios estructurales: azoles, polienos, etc.; según su procedencia: de productos biológicos o procesados químicamente; según su alcance en las siguientes áreas restringida o extensiva y según el lugar de sus operaciones (21).

Propiedades terapéuticas

Alimento: se consume el jugo y se hacen mermeladas de la cascara del fruto.

Aceite esencial: para perfumería ornamental.

Antibacteriano: Por la presencia de flavonoides.

Caracha: aplicar el jugo de limón fresco o cocinado en emplasto.

Otitis: instilar zumo de limón al oído.

Antipirético: tomar el cocimiento del fruto verde.

Antirreumático: masajes de limones podridos con Alcanfor.

Amigdalitis: tomar jugo de limón con miel de abejas o hacer gárgaras con el jugo de limón puro.

Mareos: tomar jugo de limón con azúcar.

Antiinflamatorio: el jugo o emplasto de la cascara.

Parasitosis: tomar el jugo de limón con un diente de ajo.

Diarrea: té de la cáscara.

Tos: jugo de limón con agua y miel.

Anticapa: aplicar el zumo de limón al cuero cabelludo.

Antiemético: tomar medio vaso de zumo de limón en ayunas.

Indigestión: tomar medio vaso de zumo de limón.

Hemorragia nasal: poner dos gotas de jugo de limón en la fosa nasal sangrante<sup>32</sup>.

Resfrío: inhalar el líquido del cocimiento de un limón con un producto mentolado (mentolatum o vick vaporub).

Heridas: aplicar el jugo de limón sobre la herida para desinfectar o lavar con el cocimiento concentrado de la corteza.

Diurético: por el valor estimulante de la cafeína o el mismo ácido ascórbico, puede utilizarse como diurético en tratamientos de obesidad, al aumentar la micción, eliminando líquido corporal (jugo de limón)

La vía metabólica primaria constituye el origen del metabolismo secundario de las plantas y produce una variedad de compuestos. Algunos son responsables del olor y color de las verduras, y otros son responsables de virtudes culinarias, medicinales o venenosas. Los metabolitos secundarios se acumulan en las células vegetales o se excretan del cuerpo (22) .

Los productos del metabolismo secundario más importantes son:

Aceites esenciales, los aceites esenciales son sustancias químicas volátiles de naturaleza compleja, con frecuencia están asociadas a gomas y a resinas. Estas esencias se encuentran exclusivamente en vegetales superiores. Muchos aceites esenciales son de "origen terpenoide, solo un pequeño número de ellos contienen derivados aromáticos (bencénicos) mezclados con terpenos" (22) compuestos fenólicos, se emplean a un grupo de compuestos con un anillo aromático y uno o más sustituyentes hidroxilo, generalmente llamados glucósidos. Son relativamente polares y fácilmente solubles en agua. Cuando se agrega una solución acuosa de cloruro férrico al 1%, se pueden detectar por el color verde, púrpura, azul o negro que producen. Debido a que la aromaticidad de estos compuestos fenólicos, muestra una fuerte absorción en la región ultravioleta del espectro, este método espectroscópico es muy importante para su identificación y análisis cuantitativo. Los flavonoides presentes en los extractos de etanol incluyen: flavonoides, flavonoles, isoflavonas, fenilpropano, calcona,

cetona dorada, etc. Alcaloides, en 1819, Meissner utilizó por primera vez el término alcaloide para referir un grupo de compuestos básicos, principalmente compuestos de origen vegetal. A finales de 1910, Winterstein y Trier ampliar la definición a compuestos básicos, definiendo los alcaloides de manera más amplia como compuestos básicos que contienen nitrógeno, que se pueden encontrar en plantas y animales. Se encuentran distribuidas en diferentes familias de plantas en distintas proporciones, por lo que debemos encontrarlas en grandes cantidades en las angiospermas, especialmente en plantas dicotiledóneas, especialmente las familias más abundantes son: Apocynaceae, Compositae, Rognico, Papaveraceae, Rubiaceae, Ranunculaceae, Solanaceae, etc. En monocotiledóneas, se limita a Nasturtium y Liliaceae. Rara vez se encuentran en hongos, criptogamas y gimnospermas. Químicamente, los alcaloides contienen carbono, hidrógeno y nitrógeno. Suelen formar parte de un anillo heterocíclico, mientras que otros forman parte de una cadena abierta. Algunos de ellos contienen oxígeno, lo que les confiere una serie de propiedades físicas (sólidas, cristalizables). Rara vez contiene azufre. Algunos investigadores que distinguen entre verdaderos alcaloides, protoalcaloides y pseudoalcaloides. "Los alcaloides verdaderos son compuestos de origen vegetal, con nitrógeno heterocíclico, básico, derivado de aminoácidos"<sup>5</sup>; los proalcaloides son aminas simples, que contienen nitrógeno no heterocíclico, pero también básico, que consta de aminoácidos y formación de pseudoalcaloides, que tienen la misma propiedades como alcaloides pero no se derivan de aminoácidos (22)

Las bacterias son microorganismos unicelulares, que varían en tamaño de 0,5 a 5 micrones y en varias formas, incluidas esferas, varillas y espirales. Son procariotas y por lo tanto no tienen núcleo ni orgánulos internos. Suelen tener una pared celular compuesta de peptidoglicano; muchos son móviles y tienen flagelos u otros sistemas móviles.

El género *Es* es una bacteria anaerobia gram positiva, no móvil, con forma de bastón, que fermenta azúcares. *P. acnes* forma parte de la microbiota habitual de la piel. A pesar de ser una bacteria no móvil, permanece en las zonas centrales y profundas del conducto folicular.

Las bacterias de *Cutibacterium acnes* viven predominantemente en lo profundo de los folículos y poros, aunque también se encuentran en el exterior de la piel saludable. La bacteria emplea sebo, residuos celulares y subproductos metabólicos de la piel que se encuentran en los folículos, como fuentes primordiales de energía y nutrientes. La hiperplasia sebácea que es la condición de una elevada producción de sebo por las glándulas sebáceas hiperactivas o la obstrucción del folículo puede desencadenar el aumento de las bacterias de *Cutibacterium acnes*. Esta proliferación abundante de *C. acnes* conllevarán a lesiones inflamatorias desarrollando foliculitis y acné vulgar.

#### Susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad de la cepa de *Cutibacterium acnes* a moléculas antibacterianas es amplia, tanto de fuentes farmacéuticas como naturales. El acné vulgaris es la enfermedad que habitualmente es asociada por la infección causada por la bacteria de *C. acnes*. Al ser una bacteria susceptible a una amplia variedad de antibacterianos se suele contrarrestar usualmente su proliferación con antibióticos como eritromicina, clindamicina, doxiciclina y minociclina, así como también otras familias de antibióticos poco comunes como quinolonas, cefalosporinas, pleuromutilinas, penicilinas y sulfonamidas como tratamiento para el acné sabiendo que también tienen actividad sobre el *C. acnes*.

#### **A. *Cutibacterium acnes***

*Propionibacterium acnes* vive principalmente en las profundidades de los folículos pilosos y los poros, aunque también existen en la superficie de la piel sana. En estos folículos pilosos, *P. acnes* utiliza sebo, restos celulares y subproductos metabólicos de los tejidos de la piel circundante como principal fuente de energía y nutrición. Las glándulas sebáceas hiperactivas (hiperplasia de las glándulas sebáceas) o los folículos pilosos bloqueados provocan una secreción excesiva de sebo, lo que puede provocar el crecimiento y la reproducción de *Propionibacterium acnes*. *Propionibacterium acnes* secreta muchas proteínas, incluidas varias enzimas digestivas. Esta inflamación puede causar síntomas asociados con algunas enfermedades cutáneas comunes, como foliculitis y acné vulgar. El daño causado por *Propionibacterium acnes* y

la inflamación relacionada hace que los tejidos afectados sean más propensos a ser colonizados por bacterias oportunistas (como *Cutibacterium acnes*) (32).

a) **Actividad Antibacteriana:**

Se dividen en dos categorías: antibacterianos, sustancias que impiden el crecimiento y reproducción de bacterias sin destruirlas, y esterilización, sustancias que provocan la muerte de bacterias (23).

b) **Metabolitos primarios:** Son elementos esenciales para el desarrollo de las especies vegetales como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, hormonas (3).

c) **Metabolitos secundarios:** No intervienen en funciones esenciales para las especies vegetales: alcaloides, glucósidos, aceites esenciales, resinas, etc. Se utilizan para actividades de comparar características y distinguir diferentes especies de plantas (3).

d) ***Cutibacterium acnes*:** Es un bacilo Gram-positivo, de crecimiento relativamente lento, no esporulado y anaerobio estricto, aunque se cree que posee aerotolerancia. Está vinculado al acné.

e) **ATCC:** American Type Culture Collection (24).

f) **Inóculo:** Alícuota de un cultivo bacteriano transferido a un medio de cultivo (24).

g) **UFC:** Unidad formadora de colonias.

h) **Cepa:** Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.

i) **Colonia:** Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios a agrupación de un conjunto de microorganismos de un mismo tipo (5).

j) **Disco de sensibilidad:** Discos que contienen ciertos agentes antibacterianos, utilizados para determinar la susceptibilidad antibacteriana a través de discos de difusión (5).

Nos planteamos las siguientes hipótesis

El extracto etanólico de la cascara de *Citrus x limon* (Limón) presenta actividad antibacteriana frente a los cultivos de *Cutibacterium acnés* ATCC 6919 (acné vulgaris), in vitro.

- Hay presencia de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana en el extracto etanólico de cáscara de *Citrus x de limon* (limón).

- El extracto etanólico de la cáscara de *Citrus x limon* (Limón) a las concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100% presentará actividad antibacteriana frente al cultivo de *Cutibacterium acnés* ATCC 6919 (acné vulgaris).
- En comparación con la tetraciclina, el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus x limon* (Limón) tiene mayor actividad antibacteriana frente a cultivos de *Cutibacterium acnés* ATCC 6919 (acné vulgaris).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Tipo de investigación

De acuerdo al estudio, las características y el alcance, es de tipo Cuantitativo, porque se realizan ensayos utilizando diferentes concentraciones del extracto, para luego proceder a medir los halos de inhibición para determinar la actividad óptima que ejercen. En cuanto al diseño metodológico, Observacional: se usó la observación por parte del investigador para luego registrar los datos sin intervención en la evolución natural de estos. Y de corte Transversal porque las variables son medidas es un solo período de tiempo, donde se recolecta y procesa la muestra para su medición.

### 2.2. Nivel de investigación

Explicativo: La investigación permite comprender y explicar el origen o factores de la existencia y naturaleza del hecho o fenómeno en estudio.

### 2.3. Diseño de la investigación

El Diseño a utilizar es Experimental: El investigador manipula la variable independiente (extracto etanólico del fruto de *Citrus x limon*) para tener mayor control y evidenciar la causa- actividad de la actividad antibacteriana que se requiere. El extracto vegetal se obtuvo por maceración, luego mediante cribado fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios. La actividad antibacteriana in vitro se midió mediante el método de difusión en disco llamado método Kirby-Bauer y se cultivó in vitro con cepas de control: *Cutibacterium acnes* ATCC 6919.

### 2.4. Área de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de la Facultad de Ciencias

Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, en los periodos de Octubre y Noviembre del 2019 ubicada en el distrito de Pueblo Libre

## **2.5. Población y muestra Población**

### **Población vegetal**

Se recolectó 8 kg del fruto de la especie vegetal *Citrus x limon* (Limón) procedente del distrito de Olmos, provincia de Lambayeque, departamento de Lambayeque; en el mes de Agosto del 2019.

### **Población microbiológica**

El estudio se realizó con cepas bacteriana de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919.

### **Muestra**

- Cepa de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919
- Cascara del fruto de *Citrus x limón* (Limón)

### **Muestra experimental**

- Conformada por colonias aisladas de la cepa *Cutibacterium acnes* ATCC 6919.
- Extracto etanólico de *Citrus x limon* “limón” en concentraciones al 25%, 50%, 75% y 100%.

### **Criterios de Inclusión**

Muestra Biológica: Placas Petri con agar Mueller Hinton, con 4 mm de espesor. Cultivos recientes de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919.

Especie vegetal: La cascara de los frutos con características en buen estado, sin signos de deterioro y prudentes para investigación.

### **Criterios de exclusión**

Muestra Biológica: Cepas clínicas de *Cutibacterium acnés*, Cepas de otra codificación.

Especie Vegetal: Se rechazan las cascara de los frutos en estado de descomposición y aquello que no cumplen las características organolépticas para investigación.

### **Variables y Operacionalización**

El presente estudio presenta

- Variable independiente: Extracto etanólico de las la cascara secas de *Citrus x limon* (Limón).
- Variable dependiente: Actividad antibacteriana sobre cultivos de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 (acné vulgaris).

**Tabla 1 Operacionalización de variables**

Variable	Definición conceptual	Dimensión	Indicador	Criterios de medición	Escala de medición de Variable	Instrumentos de recolección de datos
Extracto Etanólico De Citrus x limon (Limon)	Tiempo	magnitud física fundamental	24, 48 Y 72 hrs	Cuantitativa	discreta	Análisis Fitoquímico
	Concentración	relación entre la cantidad o volumen de soluto y la cantidad de disolución	25%,50%,75 % y 100%	Cuantitativa	nominal	Análisis Fitoquímico
Efecto antibacteriano de citrus x limon frente a Cutibacterium acnes	Diámetro del halo	Observación de unidad formadora de colonia.	Ausencia Presencia bacteriana	Cualitativa	discreta	Estudio microbiológico



## **Instrumentos de recolección de datos**

Se realizó por medio de la técnica de observación, en la que se registraron los datos que nos permitieron desarrollar la investigación.

### **Instrumento:**

Ficha de Observación ad – hoc

## **Procedimiento de recolección de datos Recolección y Autenticación botánica**

Las muestras se recolectaron en el distrito de Olmos, provincia de Lambayeque. Se observó la mejor especie para recolectar (fruto), utilizando una tijera para cortar y luego guardar la muestra en pequeños sacos de yute con orificios envueltos en papel Kraft para su posterior traslado a la ciudad de Lima. Una parte de la muestra recolectada se llevó a determinar la identificación taxonómica botánica, autenticada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### **Preparación de la muestra**

Se empleó 1 kg de la cascara del fruto de *Citrus x limon*, separando los residuos que podrían contaminar la muestra y ha sido cuidadosamente limpiado con alcohol de 96°. Después de limpiar, se extiendió en una fuente y se procedió a secar a temperatura ambiente durante 7 días. Posteriormente se llevó a secar a la estufa a una temperatura menor de 37° C durante 72 horas, para luego triturar de forma manual, obteniendo 500 g de muestra seca.

### **Obtención del extracto**

Se pesó los 500 g de *Citrus x limon*, adicionando etanol a 96 ° y luego se dejó macerar la muestra por el período de 2 semanas, guardando en un frasco de vidrio ámbar debidamente rotulado, renovando el solvente y en constante agitación diaria. Pasado el tiempo de maceración, se procedió a filtrar la muestra al vacío.

Determinaciones cualitativas

Materiales, Reactivos y Equipos de Laboratorio

<b>MATERIALES DE BIOSEGURIDAD</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Guantes quirúrgicos</li><li>▪ Gafas</li><li>▪ Guardapolo</li><li>▪ Gorro</li><li>▪ Mascarilla</li><li>▪ Botas desechables (para cubrir el calzado)</li></ul>

## Materiales de Laboratorio

MATERIALES DE LABORATORIO
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Vaso precipitado 50 ml, 200 ml</li><li>▪ Matraces 500 ml, 1000 ml</li><li>▪ Probetas 50 ml, 100 ml</li><li>▪ Pipetas volumétricas 1ml, 2ml, 5 ml, 10 ml</li><li>▪ Placas Petri</li><li>▪ Tubos de ensayo</li><li>▪ Tubos con tapa rosca</li><li>▪ Gradillas</li><li>▪ Bagueta</li><li>▪ Disco de antibiótico</li><li>▪ Embudo</li><li>▪ Frasco ámbar 1000 ml</li><li>▪ Frasco vidrio pequeños</li><li>▪ Luna reloj</li><li>▪ Papel kraft</li><li>▪ Placas sílica gel</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Papel filtro</li><li>▪ Capilares</li><li>▪ Goteros</li><li>▪ Mortero</li><li>▪ Pinza de madera</li><li>▪ Frasco gotero</li><li>▪ Escobillones estériles</li><li>▪ Asa de siembra</li><li>▪ Hisopos</li></ul>

## Equipos de Laboratorio e Instrumentos

EQUIPOS DE LABORATORIO E INSTRUMENTOS
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Balanza</li><li>▪ Baño María</li><li>▪ Mechero</li><li>▪ Cámara cromatográfica</li><li>▪ Cocinilla</li><li>▪ Vernier</li><li>▪ Bomba al vacío</li><li>▪ Estufa Memmert N° 36309 - 2005</li><li>▪ Incubadora Binder N° 72772 - 2014</li><li>▪ Autoclave</li><li>▪ Lámpara Luz UV</li><li>▪ Frasco ámbar 1000 ml</li></ul>

## Medios de Cultivo

MEDIOS DE CULTIVO
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Agar Mueller Hinton</li><li>▪ Caldo Trypticase soya</li></ul>

## Reactivos

REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Etanol</li><li>▪ Alcohol 96 °</li><li>▪ Cloroformo</li><li>▪ Éter de petróleo</li><li>▪ Ciclohexano</li><li>▪ Acetona</li><li>▪ Agua destilada</li><li>▪ Reactivo Shinoda</li><li>▪ Cintas de magnesio metálico (Shinoda)</li><li>▪ Ácido clorhídrico 1 %</li><li>▪ Ácido sulfúrico</li><li>▪ Alfa naftol (Rvo Molisch)</li><li>▪ Reactivo gelatina</li><li>▪ Solución Fehlling A</li><li>▪ Solución Fehlling B</li><li>▪ PB (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub></li><li>▪ FeCl 5 %</li><li>▪ NaOH 10 %</li><li>▪ Reactivo Dragendorff</li><li>▪ Reactivo Mayer</li><li>▪ Reactivo Wagner</li><li>▪ Ácido acético</li><li>▪ Reactivo Ninhidrina</li><li>▪ 2,4 DNFH</li><li>▪ Cloruro de Sodio</li></ul>

## **B. Tamizaje Fitoquímico**

Durante la reacción de identificación, se considerarán pruebas de desarrollo de color y precipitación para determinar la presencia o ausencia de metabolitos activos, con el fin de realizar el uso adecuado de reactivos específicos (17).

### **Prueba de Solubilidad**

Se utilizará 5 tubos de ensayo con determinados solventes y luego se procedió a agregar el extracto vegetal, se agitó la mezcla y se observó los resultados obtenidos:

1ml de Ciclohexano, luego se adicionó 2ml del extracto.

1ml de Etanol, luego se adicionó 2ml del extracto.

1ml de Cloroformo, luego se adicionó 2ml del extracto.

1ml de Acetona, luego se adicionó 2ml del extracto.

1ml de Agua destilada, luego se adicionó 2ml del extracto.

### **Marcha Fitoquímica**

Según Miranda, M. (2002) la marcha fitoquímica se realiza utilizando la determinación de Metabolitos secundarios.

## Guía de recolección de datos: Marcha Fitoquímica

Prueba de solubilidad del extracto etanólico de la cascara de *Citrus x limon* (Limón)

**Cuadro N° 1 Prueba de Solubilidad**

M.P	PRUEBAS DE SOLUBILIDAD				
Extracto seco de la cascara	AGUA	ETANOL	CICLOHEXANO	CLOROFORMO	ACETONA

	No soluble	Poca solubilidad	Regular solubilidad	Mayor solubilidad
LEYENDA	(-)	(+)	(++)	(+++)

Resultados

**Determinación cualitativa del extracto etanólico de la cascara de *Citrus x limon* (Limón)**

**Cuadro N° 2 Prueba de determinación Carbohidratos**

REACTIVO	FORMULACIÓN	EXTRACTO ETANOLICO DE LA CASCARA DE CITRUS X LIMÓN L.	GRUPO FITOQUIMICO
<b>MOLLISH</b>	2 ml de muestra + V gts de Rvo agitación lenta	Color violeta Formación de anillo	Presencia de Carbohidratos Generales
<b>2,4 DNFH</b>	2 ml de muestra + X gts de Rvo agitar y llevar a BM 10 min	Precipitado rojo ladrillo	
<b>TOLLENS (Carbohidratos)</b>	2 ml de muestra + V gts de Rvo agitación lenta	Formación de anillo violeta	Presencia de Carbohidratos Reductores
<b>FELLING</b>	2 ml de muestra + III gts de Rvo y llevar a BM 5 min	FELLING A: Coloración naranja FELLING B: Espejo de plata.	

	Ausencia	Escaso	Moderado	Abundante	Muy abundante
Leyenda	-	+/-	+	++	+++

**Cuadro N° 3 Prueba de Flavonoides**

REACTIVO	FORMULACIÓN	EXTRACTO ETANOLICO DE LA CASCARA DE CITRUS X LIMÓN L.	GRUPO FITOQUIMICO
<b>SHINODA</b>	2 ml de muestra + X gts de Rvo Mg metálico + X gotas HCl ( c )	Cambio de coloración, formación burbujeante	Flavonoides
<b>PB(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 1%</b>	2 ml de muestra + III gts de Rvo	Coloración amarillo tenue	

	Ausencia	Escaso	Moderado	Abundante	Muy abundante
Leyenda	-	+/-	+	++	+++

**Cuadro N° 4 Prueba para Compuestos Fenólicos**

REACTIVO	FORMULACIÓN	EXTRACTO ETANOLICO DE LA CASCARA DE CITRUS X LIMÓN L.	GRUPO FITOQUIMICO
FeCl <sub>3</sub> 5%	2 ml de muestra + III gts de Rvo, agitación lenta	Color verde	Compuestos fenólicos/taninos

	Ausencia	Escaso	Moderado	Abundante	Muy abundante
Leyenda	-	+/-	+	++	+++

**Cuadro N° 5 Prueba para Cumarinas**

REACTIVO	FORMULACION	EXTRACTO ETANOLICO DE LA CASCARA DE CITRUS X LIMÓN L.	GRUPO FITOQUIMICO
NaOH 10%	2 ml de muestra + II gts de Rvo	pp. amarillo	Cumarinas

	Ausencia	Escaso	Moderado	Abundante	Muy abundante
Leyenda	-	+/-	+	++	+++

### Cuadro N° 6 Prueba para Taninos

REACTIVO	FORMULACION	EXTRACTO ETANOLICO DE LA CASCARA DE CITRUS X LIMÓN L.	GRUPO FITOQUIMICO
Rvo de Gelatina	2 ml de muestra + 11 gts de Rvo	pp. blanco	Taninos

	Ausencia	Escaso	Moderado	Abundante	Muy abundante
Leyenda	-	+/-	+	++	+++

### Cuadro N° 7 Prueba de Alcaloides

REACTIVO	FORMULACION	EXTRACTO ETANOLICO DE LA CASCARA DE CITRUS X LIMÓN L.	GRUPO FITOQUIMICO
Dragendorff	2 ml de muestra + 11 gts de Rvo, calentar a sequedad y adicionar 1 ml HCl	Cambio de coloración rojo-naranja	Alcaloides
Mayer	2 ml de muestra + 11 gts de Rvom, calentar a sequedad y adicionar 1 ml HCl y NaCl	Coloración rojo intenso	
Wagner	2 ml de muestra + 11 gts de Rvom, calentar a sequedad y adicionar HCl	Precipitado marrón	

	Ausencia	Escaso	Moderado	Abundante	Muy abundante
Leyenda	-	+/-	+	++	+++

### Cuadro N° 8 Prueba de Aminoácidos

REACTIVO	FORMULACION	EXTRACTO ETANOLICO DE LA CASCARA DE CITRUS X LIMÓN L.	GRUPO FITOQUIMICO
Ninhidrina	2 ml de muestra + 11 gts de Rvo	Color violeta	Aminoácidos

	Ausencia	Escaso	Moderado	Abundante	Muy abundante
Leyenda	-	+/-	+	++	+++

### Cuadro N° 9 Prueba de Saponinas

REACTIVO	FORMULACION	EXTRACTO ETANOLICO DE LA CASCARA DE CITRUS X LIMÓN L.	GRUPO FITOQUIMICO
Test afrosimetrico	En un tubo de ensayo estéril se agregó 2ml de MP, adicionado a ello 1ml de agua destilada más agitación	Espuma permanencia mayor de 30 minutos	Saponinas

	Ausencia	Escaso	Moderado	Abundante	Muy abundante
Leyenda	-	+/-	+	++	+++

### Cuadro N° 10 Prueba de triterpenos

REACTIVO	FORMULACION	EXTRACTO ETANOLICO DE LA CASCARA DE CITRUS X LIMÓN L.	GRUPO FITOQUIMICO
Rvo. Lieberman	2 ml de muestra + 11 gts de Rvo	presencia de anillo color verde	Triterpenos

	Ausencia	Escaso	Moderado	Abundante	Muy abundante
Leyenda	-	+/-	+	++	+++

## **Determinación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de Limón.**

### **Ensayo Microbiológico**

Se utilizó el método Kirby Bauer, que consiste en esparcir la muestra sobre una capa delgada de agar solidificado y luego esparcirla para inhibir el crecimiento de microorganismos en el área alrededor del disco de papel empapado en antibiótico y humedecer la muestra con el extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón).

Usamos la cepa estándar *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 (American Type Culture Collection) para el trabajo, usamos agua destilada estéril como control negativo, seguimos los parámetros del INS y como control positivo y usamos el Discos de sensibilidad de tetraciclina de la marca LYD. SAC. Se uso como medio de cultivo Agar Mueller-Hinton que se agregó a la placa para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

### **Preparación del Agar Mueller- Hinton**

Utilizamos medio de agar Mueller Hinton, la cepa *Cutibacterium acnes* ATCC 6919, que se prepara de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en el cual se pesa el agar y se disuelve en agua destilada con un rango de pH de 7.2 a 7.4. A continuación, el agar se esterilizó en autoclave a 121 ° C dura 15 minutos y se colocó en un baño de agua para enfriar a 48-50 ° C. Luego, vierta el medio uniformemente en la placa de Petri a una profundidad de aproximadamente 4 mm, lo que equivale a 20 ml para una placa con un diámetro de 15 x 100 ml. Posteriormente, se dejó solidificar el medio durante 30 minutos.

### **Preparación del estándar (0,5 Mc. Farland) para el inóculo bacteriano**

Para preparar el estándar, agregue 0.5 ml de BaCl<sub>2</sub> a 9.9 ml de solución

de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mezcle y mueva constantemente para mantener la suspensión. Luego distribúyalo en 10 tubos con tapón de rosca de 4 a 6 ml, estos tubos con tapón de rosca se utilizan para preparar el inóculo y se almacenan a temperatura ambiente en la oscuridad.

### **Diluciones del extracto**

Considerando que la concentración es del 100%, agregue 100 ml de extracto de etanol y diluya con agua destilada estéril para obtener concentraciones de 75%, 50% y 25%, respectivamente. El extracto se almacena en una botella de color ámbar.

Concentración al 25% . Concentración al 50% . Concentración al 75%  
Concentración al 100%

### **Uso de los discos de antibiótico con el extracto**

Con la ayuda de perforadores tradicionales, el papel Whatman # 4 se usa para discos de antibióticos. Estos discos se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### **Preparación del inóculo**

Cuando transfiera bacterias, colóquelas en un tubo de caldo de soja Trypticasa de 4 a 5 ml. A continuación, el caldo se incuba a una temperatura de 35 ° C a 37 ° C hasta que alcanza o supera la turbidez de 0,5 según la escala Mc. Farland (aproximadamente de 2 a 6 horas). La suspensión preparada contiene aproximadamente 1,5 x 10<sup>9</sup> UFC/ ml de *C. acnes* ATCC 25922.

### **Inoculación en placas**

15 minutos después de ajustar la turbidez del inóculo de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión. Luego inocular la placa Mueller Hinton y rayarla con un hisopo.

### **Aplicación de los discos**



**Figura N° 1 De Patrón de distribución de los discos en el medio de cultivo**

Fuente: Bernal, M<sup>18</sup>.

Se colocaron los discos con la ayuda de pinzas estériles presionando suavemente sobre la superficie para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

### **Medición de los halos de inhibición**

Se midió la zona de inhibición de cada disco en una superficie oscura bajo luz reflejada. Se midió el diámetro del área incluyendo los dedos del disco, usando un cursor.

**Cuadro N° 10** Fórmula del Porcentaje de Actividad Inhibitorio Relativo (PEIR)

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Diámetro de la muestra} \times 100}{\text{Diámetro del control}}$$

Los ensayos se desarrollaron por triplicado y se realizó cultivos de control de todas las cepas para comprobar su viabilidad. El criterio utilizado para la clasificación de la actividad antimicrobiana de los extractos evaluados se detalla en el siguiente cuadro.

**Cuadro N° 11 Clasificación Actividad Antibacteriana según Porcentaje de inhibición**

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN
Inactivo	< 19 %
Poco activo	20 - 30 %
Moderadamente activo	31 - 50 %
Buena actividad	> 61 %

Fuente. Purizaca

### Procesamiento y análisis de datos

El valor medio y la desviación estándar del diámetro de supresión se formulan como medida de tendencia central, obtenida del extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón), y se detallan en las tablas y gráficos. Los resultados se obtienen mediante el método de análisis de varianza (ANOVA), utilizando el programa estadístico SPSS 23, adecuado para Windows 10,

### III. RESULTADOS

#### Estudio Fitoquímico Solubilidad del extracto

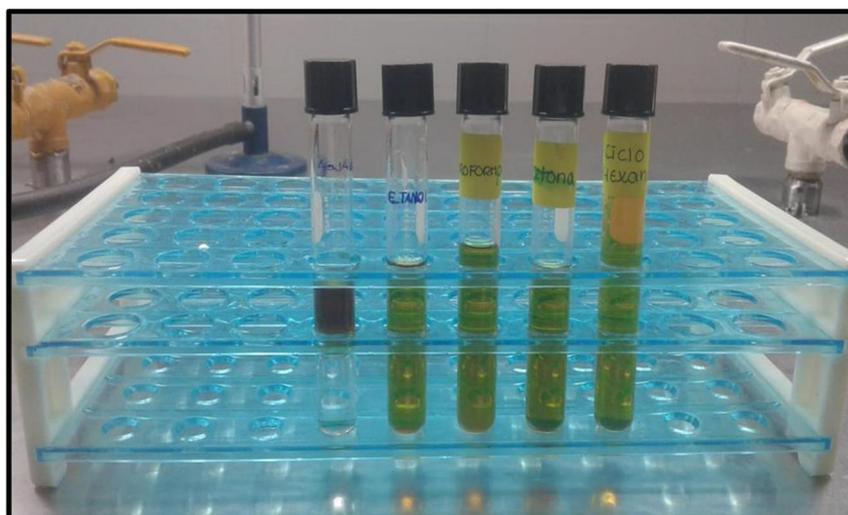
La solubilidad del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus x limon* (Limón) que se muestra en la Tabla 3 y la Figura 6 muestra que tiene una alta solubilidad en cloroformo y ciclohexano; parcialmente en etanol y acetona, pero insoluble en agua.

**Tabla 2 Ensayo de solubilidad del extracto etanólico de la cáscara**

SOLVENTE	RESULTADO
Agua	-
Etanol	+ +
Cloroformo	+ + +
Acetona	+ +
Ciclohexano	+ + +

**Leyenda:** Insoluble (-), Poco soluble (+), Soluble (++) , Muy soluble (+++)

**Figura N° 2 Solubilidad del extracto etanólico de la cascara de Citrus x limon (Limón).**



**Leyenda:** 1. Agua 2. Etanol 3. cloroformo 4. Acetona 5. CicloHexano

En la Tabla 4, los alcaloides presentes en el extracto se indican como cantidades moderadas. Como resultado de la reacción de Shinoda y otros resultados de las pruebas, se ha encontrado una gran cantidad de flavonoides, el rojo es obvio y el característico naranja se puede observar en la reacción del medio alcalino verde claro. Se encuentran muchos taninos, porque cuando se agrega 5% FeCl<sub>3</sub>, el color cambia a verde, lo que se entiende como la presencia de taninos y gelatina salada (1% gelatina + 10% NaCl), si se encuentra un precipitado blanco. Al analizar la presencia de saponinas, se ejecutó que su presencia era muy abundante, debido a que se formaba una gran cantidad de espuma cuando se agregaba agua y se agitaba la mezcla. En cuanto a aminoácidos y

cumarinas, son ricos en contenido. Gracias por la investigación fitoquímica del extracto etanólico de *Citrus x limon*. Se puede determinar la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, aminoácidos y cumarinas.

**Tabla 3** Ensayo Fitoquímico preliminar del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus x limon* (Limón).

Principio Activo	Nombre de la Reacción	Resultado	Interpretación
Flavonoides	Reacción de Shinoda	+++	Muy abundante
	Reacción con $Pb(CH_3COO)_2$	++	Abundante
Taninos	Cloruro Férrico al 5%	+++	Muy abundante
	Gelatina Salada	++	Abundante
Aminoácidos	Reacción con Ninhidrina	++	Abundante
Saponinas	Reacción con agua	+++	Muy abundante
Cumarinas	Reacción NaOH al 10%	++	Abundante
Alcaloides	Reacción Dragendorff	+	Moderado
	Reacción Mayer	+	Moderado
	Reacción Wagner	+	Moderado

Fuente Propia

### Actividad Antibacteriana del Extracto etanólico de las la cascara de *Citrus x limon* (Limón).

Como se puede observar en la Tabla 5, los resultados obtenidos del crecimiento de *C. acnes* a las 24, 48 y 72 horas se muestran en diferentes placas Petri, las cuales se realizan por triplicado para comprender mejor el estudio. Cada placa de Petri contiene una determinada concentración de extracto

etanólico. El extracto etanólico de *Citrus x limon* no mostró actividad antibacteriana significativa a una concentración de 25% a las 72 hrs, debido a que se produjo un crecimiento bacteriano muy abundante. Asimismo, una concentración de 50% a las 72 hrs mostró una gran cantidad de bacterias. Crecer y no hay evidencia de inhibición del halo. A una concentración del 75%, casi no se activó el crecimiento bacteriano durante 24 horas, y no se observaron cambios significativos a las 48 y 72 horas, pero hay evidencia de que la formación de un halo es débil. A una concentración del 100% durante 24 h casi no hubo crecimiento bacteriano, a las 48 y 72 h se formaron signos muy evidentes de inhibición del halo, comprobando la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón).

**Tabla 4** Evaluación de la actividad de *Citrus x limon* in vitro

Explicar el crecimiento bacteriano según el porcentaje efectivo de la concentración del extracto etanólico.

<b>Crecimiento Microbiano</b>	<b>Especificación Crecimiento</b>
-	Ausencia
+/-	Escaso
+	Moderado
++	Abundante
+++	Muy abundante

**Tabla 5 Evaluación de crecimiento de actividad antibacteriana del extracto, sobre *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 a las 24, 48 y 72 horas.**

Concentración	Placa Petri	Tiempo (horas)		
		24h	48h	72h
25 %	1	+++	+++	+++
	2	+++	+++	+++
	3	+++	+++	+++
50 %	1	+++	+++	+++
	2	+++	+++	+++
	3	+++	+++	+++
75 %	1	+	+	+/-
	2	+	+	+/-
	3	+/-	-	-
	1	+/-	+/-	-

100 %	2	+/-	-	-
	3	-	-	-

Fuente Propia

### **Fórmula para la determinación del porcentaje de inhibición.**

La Tabla 6 muestra el porcentaje de actividad inhibitoria relativa (PEIR) calculado aplicando la fórmula<sup>53</sup>, donde se utiliza a continuación el valor medido del diámetro de la zona de inhibición del control positivo y el valor medido del halo del extracto de prueba como referencias.

Porcentaje de Actividad Inhibitorio Relativo (PEIR)

$$\text{PEIR} = \frac{\text{X } \varnothing \text{ Halo de inhibición del extracto}}{\text{X } \varnothing \text{ Halo de inhibición del control positivo}} \times 100$$

El extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) tiene un halo inhibidor promedio de 4,77 mm cuando la queratinización de la piel del acné es del 75% y el halo inhibidor promedio de la tetraciclina como fármaco de referencia es de 21,77 mm.

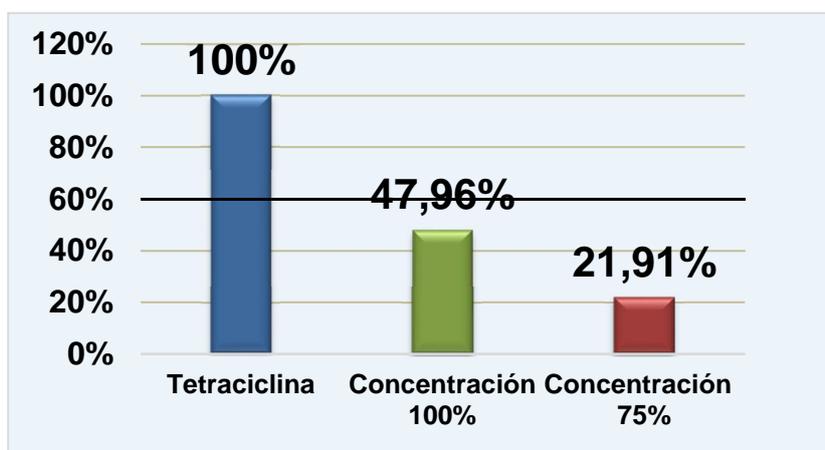
$$\text{PEIR} = \frac{4,77}{21,77} \times 100 = 21,91\%$$

El extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) tiene un halo inhibidor promedio de 10,44 mm cuando la queratinización de la piel del acné es del 100% y el halo inhibidor promedio de la tetraciclina como fármaco de referencia es de 21,77 mm.

$$\text{PEIR} = \frac{10,44}{21,77} \times 100 \% = 47,96\%$$

**Tabla 6 Lectura de formación de halos de inhibición según el porcentaje de efectividad de la concentración del extracto etanólico de *Citrus x limon***

Concentración del extracto	Lectura									Σ	Promedio (mm)
	24 horas			48 horas			72 horas				
	Lectura 1 (mm)	Lectura 2 (mm)	Lectura 3 (mm)	Lectura 1 (mm)	Lectura 2 (mm)	Lectura 3 (mm)	Lectura 1 (mm)	Lectura 2 (mm)	Lectura 3 (mm)		
25 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75 %	4	4	4	4	5	5	5	6	6	43	4,77
100 %	4	6	6	10	10	12	14	16	16	93.99	10,44
<u>Tetraciclina</u>	16	18	18	20	22	22	26	28	28	196	21,77
Agua Destilada 0 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



**Gráfico N° 1 Porcentaje de actividad inhibitorio relativo de la Tetraciclina vs. El extracto etanólico al 100% y 75 %**

### **Interpretación de los resultados:**

Según el informe de la Tabla 6, los resultados obtenidos de las lecturas para suprimir la formación de halo son: El extracto a la concentración de 25% y 50% no formará un halo inhibitor, por lo que no tiene actividad antibacteriana a esta concentración.

Si la concentración del 75% del extracto formaba halos inhibidores en las tres muestras realizadas, los mejores resultados se observaron en las 72 horas de incubación. La suma media es de 43 mm y el rango medio es de 4,77 mm.

Se informa que, si el extracto forma un halo inhibitor en muestras por triplicado, la concentración es del 100%, que es más significativa que la concentración del 75%. La suma media es de 93,99 mm y el rango medio es de 10,44 mm. En las muestras tratadas por triplicado, la suma promedio de los resultados de la tetraciclina utilizada como muestra de control fue de 196 mm, y el rango promedio fue de 21,77 mm, con una actividad inhibitora del 100%. En comparación con los extractos de etanol al 75% y 100%, su actividad inhibitora es del 21,91% y del 47,96%, respectivamente.

**Tabla 7 Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de *Citrus x limon* según concentración. (Expresados en %)**

<b>Concentración del extracto vs control Positivo</b>	<b>Promedio (mm)</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>	<b>Actividad antibacteriana</b>
Extracto de 75 % vs Tetraciclina	4,77	21,91%	Poco activo
Extracto de 100 % vs Tetraciclina	10,44	47,96%	Moderadamente activo
<b>Tetraciclina</b>	21,77	100%	Activo

Fuente Propia

**Interpretación de los resultados:**

Se aplica la fórmula utilizada para determinar el porcentaje de inhibición.

En los extractos a la concentración del 25% y 50% el reporte no inhibió la formación de halo, mientras que en el extracto a la concentración del 75% reportó una actividad inhibidora del 21.91%. Tomando como referencia la tetraciclina, debería tener una actividad inhibidora del 100%.

En el extracto, una concentración del 100%, reportó una actividad inhibidora del 47,96%, tomando como referencia la tetraciclina, tendrá una actividad inhibidora del 100%.

**Análisis estadístico de los resultados obtenidos en los ensayos in vitro.**

**Tabla 8 Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad del extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) sobre la actividad inhibidora de 24 horas del cultivo de acnés.**

**Unidireccional**

Descriptivos						
Lectura_1_24h						
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
25%	3	,00	,000	,000	,00	,00
50%	3	,00	,000	,000	,00	,00
75%	3	4,00	,000	,000	4,00	4,00
100%	3	5,33	1,155	,667	2,46	8,20
Tetraciclina	3	18,67	3,055	1,764	11,08	26,26
Agua destilada	3	,00	,000	,000	,00	,00
Total	18	5,62	6,801	1,484	2,52	8,71

ANOVA					
Lectura_1_24h					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	900,952	6	150,159	87,5	,000
Dentro de	24,000	14	1,714	93	

Grupos					
Total	924,952	20			

**Tabla 9 Análisis de la varianza (ANOVA) de las actividades entre los halos de inhibición por extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) sobre cultivos de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 a las 48h**

**Unidireccional**

Descriptivos						
Lectura_1 _48h						
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
25%	3	,00	,000	,000	,00	,00
50%	3	,00	,000	,000	,00	,00
75%	3	4,67	,577	,333	3,23	6,10
100%	3	10,67	1,155	,667	7,80	13,54
Tetraciclina	3	21,33	1,155	,667	18,46	24,20
Agua destilada	3	,00	,000	,000	,00	,00
Total	21	7,14	7,882	1,720	3,55	10,73

ANOVA
Lectura_1 _48h

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1233,905	6	205,651	332,205	,000
Dentro de Grupos	8,667	14	,619		
Total	1242,571	20			

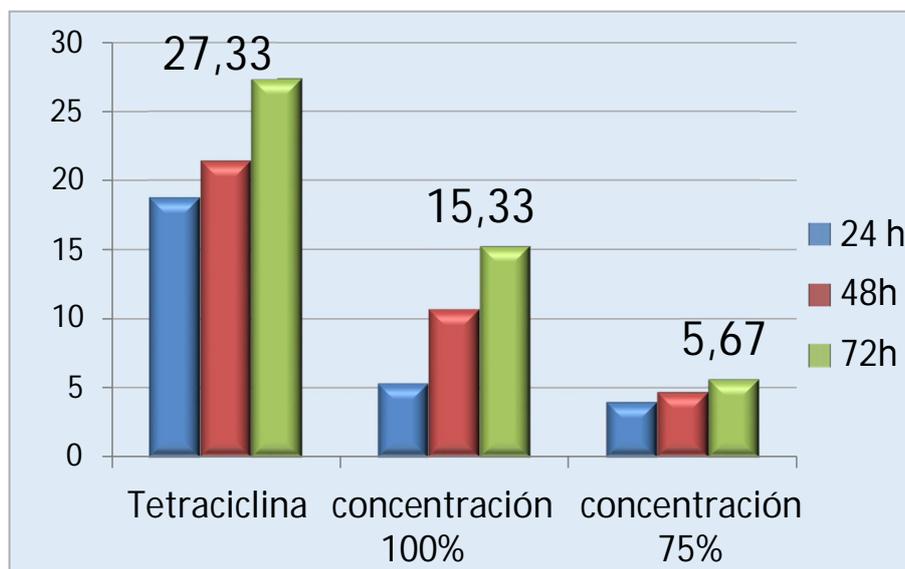
**Tabla 10 Análisis de la varianza (ANOVA) de las actividades entre los halos de inhibición por extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) sobre cultivos de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 a las 72h**

Unidireccional

Descriptivos						
Lectura_1_72h						
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
25%	3	,00	,000	,000	,00	,00
50%	3	,00	,000	,000	,00	,00
75%	3	5,67	,577	,333	4,23	7,10
100%	3	15,33	1,155	,667	12,46	18,20
Tetraciclina	3	27,33	1,155	,667	24,46	30,20
Agua destilada	3	,00	,000	,000	,00	,00
Total	21	9,29	10,184	2,222	4,65	13,92

ANOVA					
Lectura_1_72h					
	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2065,619	6	344,270	556,128	,000
Dentro de Grupos	8,667	14	,619		

Total	2074,286	20			
-------	----------	----	--	--	--



**Gráfico 2. Lectura de formación de los halos de inhibición según el porcentaje de efectividad de la concentración del extracto etanólico de *Citrus x limon L.* al 75 %y 100% vs Tetraciclina a las 24, 48, y 72h**

Interpretación de los resultados estadísticos:

Las Tablas 8, 9 y 10 mostró el análisis de varianza de la actividad de cultivo de *P. acnes* y su prueba de comparación múltiple e intervalo de confianza del 95%, como se muestra a continuación: Las bacterias de la cutícula bacteriana encontraron significación estadística. En el modelo de calibración ( $p = 0,000$ ), la intersección entre extracto de etanol, bacterias y concentración se determinó de la misma manera que la significación estadística ( $p = 0,000$ ) para diferentes concentraciones Concentración ( $p = 0,000$ ).

La Tabla 10 muestra la concentración media de 72 horas, que es 5.67 al 75% y 15.33 al 100%. En el control positivo, la tetraciclina es 27,33.

|

**Tabla 11 A las 24 h, se comparó posteriormente la actividad inhibidora del extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) sobre el cultivo de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 y comparaciones múltiples (ANOVA).**

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: Lectura_1_24h							
	(I) Concentración del extracto	(J) Concentración del extracto	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	25%	50%	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
		75%	-4,000 *	1,069	,028	-7,65	-,35
		100%	-5,333 *	1,069	,003	-8,98	-1,68
		Tetraciclina	-18,667 *	1,069	,000	-22,32	-15,02
		Agua destilada	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
	50%	25%	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
		75%	-4,000 *	1,069	,028	-7,65	-,35
		100%	-5,333 *	1,069	,003	-8,98	-1,68
		Tetraciclina	-18,667 *	1,069	,000	-22,32	-15,02
		Agua destilada	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
	75%	25%	4,000 *	1,069	,028	,35	7,65
		50%	4,000 *	1,069	,028	,35	7,65
		100%	-1,333	1,069	,864	-4,98	2,32

		Tetraciclina	-14,667 *	1,069	,000	-18,32	-11,02
		Agua destilada	4,000 *	1,069	,028	,35	7,65
100%	25%		5,333 *	1,069	,003	1,68	8,98
	50%		5,333 *	1,069	,003	1,68	8,98
	75%		1,333	1,069	,864	-2,32	4,98
	Tetraciclina		-13,333 *	1,069	,000	-16,98	-9,68
	Agua destilada		5,333 *	1,069	,003	1,68	8,98
Tetraciclina	25%		18,667 *	1,069	,000	15,02	22,32
	50%		18,667 *	1,069	,000	15,02	22,32
	75%		14,667 *	1,069	,000	11,02	18,32
	100%		13,333 *	1,069	,000	9,6	16,98
	Agua destilada		18,667 *	1,069	,000	15,02	22,32
Agua destilada	25%		,000	1,069	1,00	-3,65	3,65
	50%		,000	1,069	1,00	-3,65	3,65
	75%		-4,000 *	1,069	,028	-7,65	-,35
	100%		-5,333 *	1,069	,003	-8,98	-1,68
	Tetraciclina		-18,667 *	1,069	,000	-22,32	-15,02

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

**Tabla 12 Comparación post-hoc y comparación múltiple (ANOVA) de la actividad del extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) en el halo inhibitor. *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 cultivado durante 48 horas.**

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples								
Variable dependiente: Lectura_1_48h								
	(I) Concentración del extracto	(J) Concentración del extracto	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza		
						Límite inferior	Límite superior	
HSD Tukey	25%	50%			1,00			
		75%	,000	,642	0	-2,19	2,19	
		100%	-4,667*	,642	,000	-6,86	-2,47	
		Tetraciclina Agua destilada	-10,667*	,642	,000	-12,86	-8,47	
			-21,333*	,642	,000	-23,53	-19,14	
			,000	,642	1,00	-2,19	2,19	
		50%	25%			1,00		
	75%		,000	,642	0	-2,19	2,19	
	100%		-4,667*	,642	,000	-6,86	-2,47	
	Tetraciclina Agua destilada		-10,667*	,642	,000	-12,86	-8,47	
	-21,333*		,642	,000	-23,53	-19,14		
		,000	,642	1,00	-2,19	2,19		
	75%	25%	4,667*	,642	,000	2,4	6,86	
50%					7			

		100% Tetraciclina a Agua destilada	4,667 <sup>*</sup>	,642	,000	2,4	6,86
			-6,000 <sup>*</sup>	,642	,000	7	-3,81
			-16,667 <sup>*</sup>	,642	,000	-8,19	-14,47
			4,667 <sup>*</sup>	,642	,000	-18,86	6,86
						2,47	
	100%	25%	10,667 <sup>*</sup>	,642	,000	8,4	12,86
						7	

	50%	10,667*	,642	,000	8,47	12,86
	75%	6,000*	,642	,000	3,81	8,19
	Tetraciclina	-10,667*	,642	,000	-12,86	-8,47
	Agua destilada	10,667*	,642	,000	8,47	12,86
Tetraciclina	25%	21,333*	,642	,000	19,14	23,53
	50%	21,333*	,642	,000	19,14	23,53
	75%	16,667*	,642	,000	14,47	18,86
	100%	10,667*	,642	,000	8,47	12,86
	Agua destilada	21,333*	,642	,000	19,14	23,53
Agua destilada	25%	,000	,642	1,00 0	-2,19	2,19
	50%	,000	,642	1,00 0	-2,19	2,19
	75%	-4,667*	,642	,000	-6,86	-2,47
	100%	-10,667*	,642	,000	-12,86	-8,47
	Tetraciclina	-21,333*	,642	,000	-23,53	-19,14

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

**Tabla 13 Comparación post-hoc y comparación múltiple (ANOVA) de la actividad, halo inhibidora del extracto etanólico *Citrus x limon* (Limón) en el cultivo de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 a las 72 h**  
**Pruebas post hoc**

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: Lectura_1_72h							
	(I) Concentración del extracto	(J) Concentración del extracto	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	25%	50%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
		75%	-5,667*	,642	,000	-7,86	-3,47
		100%	-15,333*	,642	,000	-17,53	-13,14
		Tetraciclina	-27,333*	,642	,000	-29,53	-25,14
		Agua destilada	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
	50%	25%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
		75%	-5,667*	,642	,000	-7,86	-3,47
		100%	-15,333*	,642	,000	-17,53	-13,14
		Tetraciclina	-27,333*	,642	,000	-29,53	-25,14
		Agua destilada	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
75%	25%	5,667*	,642	,000	3,47	7,86	
	50%	5,667*	,642	,000	3,47	7,86	

		100%	-9,667*	,642	,000	-11,86	-7,47
		Tetraciclina	-21,667*	,642	,000	-23,86	-19,47
		Agua destilada	5,667*	,642	,000	3,47	7,86
	100%	25%	15,333*	,642	,000	13,14	17,53

	50%	15,333*	,642	,000	13,14	17,53
	75%	9,667*	,642	,000	7,47	11,86
	Tetraciclina	-12,000*	,642	,000	-14,19	-9,81
	Agua destilada	15,333*	,642	,000	13,14	17,53
Tetraciclina	25%	27,333*	,642	,000	25,14	29,53
	50%	27,333*	,642	,000	25,14	29,53
	75%	21,667*	,642	,000	19,47	23,86
	100%	12,000*	,642	,000	9,81	14,19
	Agua destilada	27,333*	,642	,000	25,14	29,53
Agua destilada	25%	,000	,642	1,00 0	-2,19	2,19
	50%	,000	,642	1,00 0	-2,19	2,19
	75%	-5,667*	,642	,000	-7,86	-3,47
	100%	-15,333*	,642	,000	-17,53	-13,14
	Tetraciclina	-27,333*	,642	,000	-29,53	-25,14

**\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05. Interpretación de los resultados estadísticos:**

Las Tablas 12, 13 y 14 muestran múltiples comparaciones de la actividad de inhibición del halo del extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón). El cultivo de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 muestra lo siguiente: Según el nivel de concentración del extracto etanólico de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la inhibición del halo, significativa ( $p = 0,000$ )  $p < 0,05$ ; en comparación con otros niveles, la mayor diferencia es el nivel de concentración de 100%.

## 4.2 Contrastación de hipótesis

En un estudio in vitro, el extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) a una concentración del 25% no tuvo una actividad significativa sobre la actividad antibacteriana en el cultivo de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919. Dado que no se ha observado supresión de la formación de halo.

En un estudio in vitro, la concentración del extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) fue del 50%, lo que no tuvo un actividad significativo sobre la actividad antibacteriana en el cultivo de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919. Por tanto, a esta concentración, no tiene actividad antibacteriana.

En un estudio in vitro, el extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) a una concentración del 75% tuvo una actividad significativa sobre la actividad antibacteriana en el cultivo de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919. Dado que la inhibición de la formación de halo se produce a las 24 h de cultivo, el mejor resultado se produce a las 72 h de cultivo, si tiene actividad antibacteriana.

En un estudio in vitro, el extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) al 100% de concentración mostró una actividad significativa sobre la actividad antibacteriana en el cultivo de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919. Dado que la inhibición de la formación de halo se produce a las 24 h de cultivo, el mejor resultado se produce a las 72 h de cultivo, si tiene actividad antibacteriana.

#### IV. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En cuanto la respuesta de las investigaciones fitoquímica del extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) realizado se confirmó la presencia de metabolitos secundarios, como alcaloides cuyo crecimiento microbiano es moderado, también es rico en flavonoides, además de otros como taninos, saponinas de aminoácidos y cumarinas.

Bonilla et al. publicaron la evaluación fitoquímica y actividad biológica de *Citrus x limon* (Limón), y determinaron la evidencia existente de aminoácidos, taninos, compuestos fenólicos, esteroides y / o triterpenos, quinonas y leuco antocianinas; destacando los principales metabolitos activos flavonoides, esteroides y triterpenos<sup>2</sup>.

En la prueba de cromatografía de capa fina de flavonoides, el grupo fitoquímico es la presencia de 5 flavonoides diferentes, que se observan en 5 puntos de la placa de prueba. Uno de los alcaloides en la cromatografía en capa fina mostró fluorescencia a 250 nm, lo que indica la presencia de alcaloides.

En trabajos de investigación, estudios in vitro han confirmado que 75% y 100% de extractos etanólico *Citrus x limon* tienen actividad antibacteriana positiva en el cultivo de *C. acnes*. En su estudio Jaramillo J, et al. Señala que el género *Camellia* presenta Actividad de inhibición del extracto de Limón en concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% frente a *Streptococcus mutans* en 20 muestras". Y Ulloa T. Susceptibilidad in vitro del *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 frente a tres extractos etanólicos diferentes de concentración de *Citrus x limon* (Limón). Concluyó que el *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 es susceptible a los extractos etanólicos de 5%, 10% y 20% de *Citrus x limon* "Limón"

En cuanto a la investigación, los resultados obtenidos en el extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón), en la determinación de la actividad antibacteriana; en la muestra del *Cutibacterium acnes* ATCC 6919, Se ha confirmado que el extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) a una concentración del 75% mostró una actividad antibacteriana moderadamente significativa, mientras que el

extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) a una concentración del 100% mostró una mejor actividad antibacteriana debido a que la medición del halo fue superior. Por lo tanto, se demostró que, en la prueba, la concentración del extracto etanólico *Citrus x limon* (Limón) con actividad antibacteriana resultó en una concentración de 75% y 100%, respectivamente.

Por tanto, se comprueba en la prueba que señalaremos la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en la medida de diámetro obtenida en la inhibición del halo utilizando diferentes concentraciones de extracto etanólico frente a *Cutibacterium acnes* ATCC 6919, destacando la concentración del 75% y 100%. Considerando que tienen un actividad antibacteriano positivo sobre el cultivo de Dermatitis acnés. La razón de la diferencia en la actividad de los extractos de etanol puede deberse a los metabolitos secundarios encontrados: flavonoides, alcaloides, fenoles, cumarinas, estos se encuentran en todo el grupo de plantas en mayor proporción.

En su estudio Purizaca M., et al., Publicaron sobre la Actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de las hojas, flores, tallo y raíz de *Schkuhria pinnata* (canchalagua) frente a cepas de *Propionibacterium acnes*, en el trabajo usaron diferentes fármacos controles pertenecientes a distintos grupos farmacológicos como: Tetraciclinas, Quinolonas, Macrólidos y Penicilinas; escogiendo de cada grupo un fármaco para ser comparado con el extracto etanólico, obteniendo como resultado que el extracto presentó mayor halo de inhibición.

Siendo la Tetraciclina uno de los fármacos utilizados como tratamiento de primera línea en caso de acné; El fármaco de control positivo se seleccionó para determinar el porcentaje de actividad antibacteriano del extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón), por lo que la actividad inhibidora se calculó en relación con las concentraciones de 75% y 100%, que son los valores medidos más altos de la concentración presentada del halo inhibitor. Formación, en comparación con tetraciclina Comparada para obtener valores de 21,96% y 47,96%, respectivamente. Por esta razón, se cree que el extracto de etanol al 100% tiene una mayor actividad antibacteriana.

## V. CONCLUSIONES

Si existe actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus x limon* (Limón) en cultivos de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 (acné vulgaris), in vitro.

Si existen mayor presencia de metabolitos secundarios en el extracto siendo; Flavonoides, Taninos y Saponinas.

El extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón) en las concentraciones de 75 por ciento presento un porcentaje de inhibición de 21,91 y 100 por ciento su porcentaje de inhibición fue 47,96 presentando actividad antibacteriana en los cultivos de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919, in vitro.

Estudios in vitro han demostrado que la concentración del 100% de extracto de etanol cítrico x limón tiene una actividad antibacteriana del 47,96% y una inhibición del halo de 10,44 mm para el control de tetraciclina (TE).

#### IV. RECOMENDACIONES

La universidad académica que imparte la debe trabajar con la autoridad que ha adquirido para promover la investigación sobre las diversas plantas nativas que cultivamos en el Perú. Se realizan nuevas investigaciones porque el Perú cuenta con amplias defensas contra los insumos naturales que se encuentran en los metabolitos secundarios de cada planta con propiedades terapéuticas.

Realizar nuevas investigaciones fitoquímicas farmacológicas microbiológicas de la planta *Citrus x limon* (Limón) siendo un potencial fitoterapéutico en el beneficio de la salud de la población.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Convenio Organización Andina de Salud-Hipólito Unanue. Se recomienda que las plantas medicinales subregionales andinas sean incluidas en la lista del sistema de salud. Lima, Perú. Letra. ; Octubre de 2015.
2. Pablo S. Separación y evaluación de la actividad antioxidante de los flavonoides de *Eysenhardtia polystachya* (Ort.) Sarg.. Tesis para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Químico biológicas. México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional ; 2016.
3. Landeta J., Naranjo L.,. "Evaluación de la actividad antibacteriana de Citrus x limón (Limón). Treinta Reales, utilizando un modelo in vivo". Quito.;; Marzo, 2015.
4. Leonardo Sánchez-Saldaña. El acné. [Online].; 2015 Lima.Peru.. Available from: [Disponibile en: https://bit.ly/31a6gLZ](https://bit.ly/31a6gLZ).
5. Botanical-online. Características de la fitoterapia.. [Online].; 2017. Available from: <https://bit.ly/3j14cMz>.
6. El nuevo diario. El Acné es una enfermedad crónica que afecta la autoestima. [Online].; 2018. Available from: <https://bit.ly/3kdzrFH>.
7. León Rodríguez L. "La multirresistencia antibacteriana de las cepas de *P. acnes* aisladas en el espectro antibacteriano del hospital regional produce un espectro extendido de Betalactamasas (blee)" Manuel Nuñez Butrón" Puno; 2015.
8. 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 *Cutibacterium acnes* y *Escherichia coli*. Univ. Cienc. Soc. [Online].; 2015 [cited 2020 octubre 12. Available from: <https://bit.ly/37ajf46>.
9. Acaro F, Arroyo J. "Actividad s anticonceptivos y post-incidentes de extractos etanólicos de citrus x hojas de limón", "Limón" en ratas hembras Holtzmann. Facultad de Farmacia y Bioquímica. , Unidad de posgrado. Tesis de Postgrado, Farmacia y Bioquímica. Unidad de posgrado. Tesis de

Postgrado, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Lima, Perú.

10. Fisher k, Phillips CA. La actividad de los aceites esenciales de limón, naranja y bergamota y sus componentes en la supervivencia de *Campylobacter jejuni*, *Cutibacterium acnes*O157, *Listeria monocytogenes*, *Cutibacterium cereus* y *Cutibacterium acnes* in vi; 2006.
11. Estrada A. Efectividad antibacteriana in vitro del aceite esencial Citrus Limón en diferentes concentraciones sobre el *Streptococcus Mutans*, Cusco, 2017.[Internet].Perú: Universidad Andina del Cuzco. Facultad de Ciencias de la Salud. 2017.. [Online].; 2017 [cited 2020 10 12. Available from: <https://bit.ly/3k0RuyC>.
12. Perez J. Actividad del agente antimicrobiano del aceite esencial de canela y aceite esencial de limón en la cobertura comestible y el tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras y aceptabilidad general. [Online].; 2016 [cited 2018 agosto 14. Availablefrom: <https://bit.ly/3KfR1Gr>
13. Al-Aamri M, Al-Abousi N, Al-Jabri S, Alam T, Khan S. Composición química y actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro del aceite esencial de Citrus aurantifolia L. hojas cultivadas en el este de Omán. Rev.Food Science and Technology. [Online].; 2018 [cited 2019 OCTUBRE 24. Available from: <https://bit.ly/316G9pp>.
14. Barragán G., Janeth Elizabeth. “Actividad de inhibición del extracto de Limón en concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% frente a streptococcus mutans en 20 muestras in vitro”. Facultad de Odontología. Quito; 2018.
15. Organización Mundial de la Salud. Definición de Medicinal tradicional. Ginebra: Dra. Xiaorui Zhang. [Online].; 2019 [cited 2020 Octubre 13. Available from: <https://bit.ly/377hsgn>.
16. Rainer W. Bussmann, Douglas Sharon. Plantas Medicinales de los Andes y la Amazonía. La Flora Mágica y Medicinal del Norte del Perú. Biblioteca Nacional del Perú. 1st ed. Perú ; 2015.
17. Organización Mundial de la Salud. Lista de bacterias para las que se necesita urgentemente nuevos antibióticos. [Internet]. Ginebra. [Online].; 27 febrero 2017 [cited 2020 octubre 13. Available from: <https://bit.ly/313oDIR>.

18. Goodman y Gilman. La base farmacológica del tratamiento.. McGraw-Hill; ed. Duodécima , editor.; 2011.
19. Iannacone J, Valle R, Argota G, Carhuapoma M, Castañeda L. Toxicidad de agentes antiparasitarios, agentes antimicrobianos e insecticidas para las larvas de camarón salado *Artemia Franciscana* (Crustacea: Artemiidae). *Revista de Toxicología*. 2016;33(13):18th ed.; 2016.
20. Bruneton, J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2nd ed.
21. Kuklinski C. Pharmacognosy.. Investigar medicamentos y sustancias medicinales de origen natural. Barcelona : Omega; 2000.
22. J.Henson j.m. gatell, mt. jimenez., g.. prats.guia terapeutica antimicrobiana. 240th ed.; 2002.
23. Clarin.Acne. Usar para eliminar granos. [Online].; 2018. Available from: <https://bit.ly/33Z4rUb>.
24. Botanical-online. El mundo de las plantas. [Online].; 2018. Available from: <https://bit.ly/2SRM7pA>.

# **ANEXOS**

## Anexo 1. MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE CASCARA DE <i>Citrus x limon</i> (LIMON) FRENTE A CUTIBACTERIUM ACNES ATCC IN VITRO							
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS	CLASIFICACIÓN DE VARIABLES	INDICADORES	METODOLOGIA	POBLACION, MUESTRA	INSTRUMENTO
<p><b>Problema General:</b></p> <p>¿Cuál es la actividad antibacteriana del extracto etanolico de la cascara de <i>Citrus x limon</i> (Limon) en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris), in vitro?</p>	<p><b>Objetivo General:</b></p> <p>Determinar cuál es el <del>actividad antibacteriano</del> actividad antibacteriana del extracto etanolico de la cascara de <i>Citrus x limon</i> (Limon) en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris), in vitro</p>	<p><b>Hipótesis Principal:</b></p> <p>Existe actividad antibacteriano del extracto etanolico de la cascara de <i>Citrus x limon</i> (Limon) en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris), in vitro.</p>	<p><b>Variable Independiente:</b></p> <p>a) Extracto etanolico de la cascara de <i>Citrus x limon</i> (Limon)</p>	<p><b>VI:</b></p> <p>Metabolitos secundarios</p> <p>Dosis</p> <p>Concentración al 25 %</p> <p>Concentración al 50 %</p> <p>Concentración al 75 %</p> <p>Concentración al 100 %</p>	<p><b>DISEÑO:</b></p> <p>Experimental</p> <p><b>TIPO:</b></p> <p>Aplicativo</p> <p><b>NIVEL:</b></p> <p>Explicativo</p>	<p><b>POBLACION VEGETAL</b></p> <p>Constituida por la especie <i>Citrus x limon</i> (Limon)</p> <p><b>MUESTRA BACTERIANA</b></p> <p><i>Cutibacterium acnes</i> ATCC® 6919</p> <p><b>MUESTRA VEGETAL</b></p> <p>500 gr de hojas secas de <i>Citrus x limon</i> (Limon)</p>	<p><b>TECNICA</b></p> <p>Tamizaje fitoquímico</p> <p>Método de Kirby-Bauer</p> <p><b>INSTRUMENTO Y RECOLECCIÓN DE DATOS</b></p> <p>Ficha de observación ad-hoc</p> <p><b>PROCESAMIENTO DE DATOS</b></p> <p>Estadística</p>
<p><b>Problemas Especificos:</b></p> <p>¿Existe metabolitos secundarios presentes en el extracto etanolico de la cascara de <i>Citrus x limon</i> (Limon)?</p> <p>¿Cuál es la concentración del extracto etanolico de la cascara de <i>Citrus x limon</i> (Limon) con mayor actividad antibacteriano en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris)?</p> <p>¿Cuál será la actividad antibacteriana del extracto etanolico de la cascara de <i>Citrus x limon</i> (Limon) comparado con tetraciclina frente a cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris)?</p>	<p><b>Objetivos Especificos:</b></p> <p>Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanolico de la cascara de <i>Citrus x limon</i> (Limon).</p> <p>Determinar la concentración del extracto etanolico de la cascara de <i>Citrus x limon</i> (Limon) con mayor actividad antibacteriano en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris).</p> <p>Comparar la actividad antibacteriana del extracto etanolico de la cascara de <i>Citrus x limon</i> (Limon) con tetraciclina frente a cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris).</p>	<p><b>Hipótesis Especificas:</b></p> <p>Existen presencia de metabolitos secundarios en el extracto etanolico de la cascara de <i>Citrus x limon</i> (Limon)</p> <p>Existe concentración del extracto etanolico de la cascara de <i>Citrus x limon</i> (Limon) con mayor actividad antibacteriano en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris).</p> <p>Existe actividad antibacteriana del extracto etanolico de la cascara de <i>Citrus x limon</i> (Limon) comparado con tetraciclina frente a cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris)</p>	<p><b>Variable Dependiente:</b></p> <p>b) Actividad antibacteriano</p>	<p><b>VD:</b></p> <p>Diámetro de halos</p> <p>Mm</p>			

## Anexo 2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

 **UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
Universidad Del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

 **MUSEO DE HISTORIA NATURAL**

"Año de la lucha contra la corrupción e impunidad"

**CONSTANCIA N° 216-USM-2019**

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

La muestra vegetal (planta completa) recibida de **Alinda Kusta Espinoza Ramos, Milagros Desire Huiñac Saavedra**, estudiantes de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; **Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica**, ha sido estudiada y clasificada como: *Citrus x limon*, y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de clasificación de Cronquist (1981):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUB CLASE: ROSIDAE**

**ORDEN: SAPINDALES**

**FAMILIA: RUTACEAE**  
**GENERO: *Citrus***  
**ESPECIE: *Citrus x limon***

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

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

Lima, 08 de Noviembre de 2019

  
**MAG ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA**  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS



---

Av. Arenales 1256, Jesús María  
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfono:  
619-7000 anexo 3701, 3703, 3704

Email: [museohn@unmsm.edu.pe](mailto:museohn@unmsm.edu.pe)  
<http://museohn.unmsm.edu.pe>

### Anexo 3. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE *Cutibacterium acnes* ATCC

6919



**Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release**

<p><b>Specifications</b>                  Microorganism Name: <i>Cutibacterium acnes</i>                  Catalog Number: D17D                  Lot Number: 170-21**                  Reference Number: ATCC® 6919™**                  Purity: Pure                  Passage from Reference: 3</p>	<p><b>Expiration Date:</b> 2020/5/31  <b>Release Information:</b>                  Quality Control Technologist: Tracy A Blenker                  Release Date: 2018/0/25</p>
--	---

<b>Performance</b>	
<p><b>Macroscopic Features:</b>                  Punctiform to small, circular, convex, entire edge, glistening, becoming A/R SBAP                  larger as colonies age</p> <p><b>Microscopic Features:</b>                  Small gram positive rods</p>	<p><b>Medium:</b></p> <p><b>Method:</b>                  Gram Stain (1)</p>

**ID System: MALDI-TOF (1)**  
 See attached ID System results document

  
 Amanda Kuperus  
 Quality Control Manager  
 AUTHORIZED SIGNATURE

\*D number: 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 the certificate is the actual base lot number.

Note for Users: Although the Vitek® 2 panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

  
ATCC Accredited  
 Reference Material Provider  
 CRM 4345-02

  
ATCC Licensed  
 Derivative

  
ATCC Accredited  
 TESTING CERT #2655-01

(\*) The ATCC Licensed Derivative product, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC testing marks are trademarks of ATCC Microbiology, Inc. It is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC's culture.

(†) These tests are accredited to ISO15189:2013.

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

Page 1 of 1

DOC-288

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	<b>High consistency:</b> The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	<b>Low consistency:</b> The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	<b>No consistency:</b> The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: *Culibacterium acnes*  
 Sample Description: C170  
 Sample ID: 170-21  
 Sample Creation Date/Time: 2018-05-19T17:11:42.583 MB  
 Applied MSP Library(ies): BDAL Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listana

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
D3 (+++)(A)	170-21	<i>Propionibacterium acnes</i>	2.96

Comments:

N/A



Figura N° 3 Fruto de Limón. *Citrus x limon*.

Fuente: herbolaria fandom (2014)

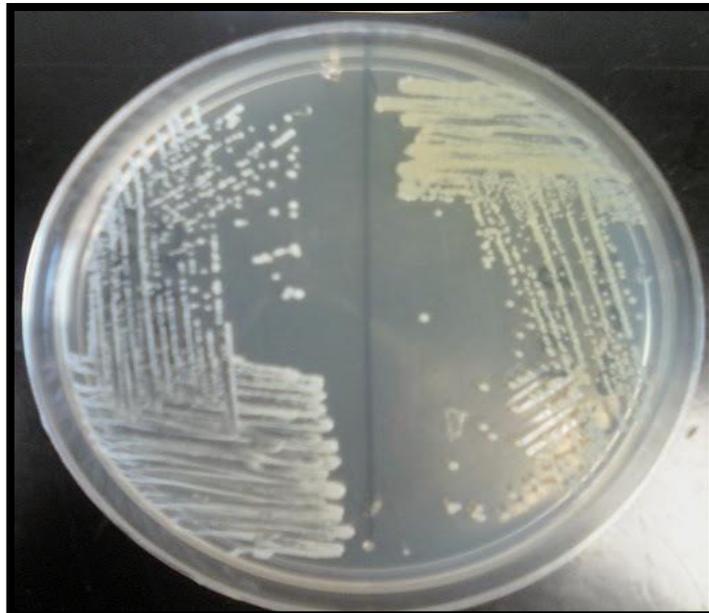


Figura N° 4 Características macroscópicas de *Cutibacterium acnes*

Fuente: Lee, C.J. (2013)

**Tabla 14 Sistematización taxonómica del Limón**

Orden	Sapindales
Familia	Rutaceae
Tribu	Citreae
Género	<i>Citrus</i>
Especie	<i>C. Limón L.</i>
Nombre científico	<i>Citrus x limon</i> , 1765

Fuente: Arias J. (2014)<sup>26</sup>

**FOTO N° 1 Preparación del extracto etanólico de Citrus x limon**

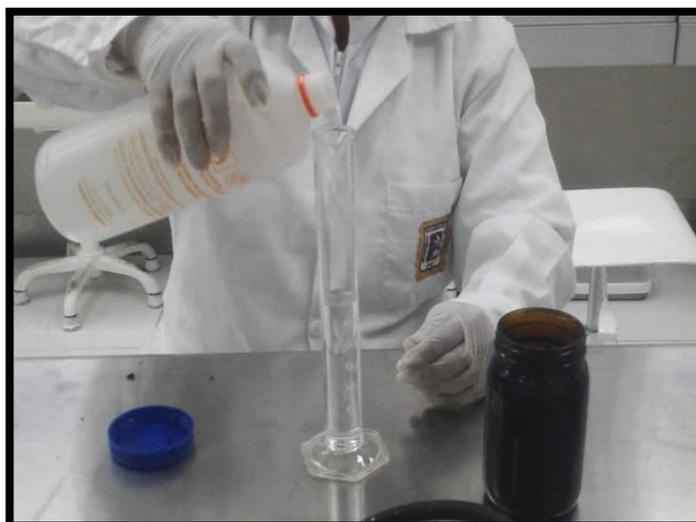


FOTO N° 2 Obtención del extracto etanólico de *Citrus x limon*

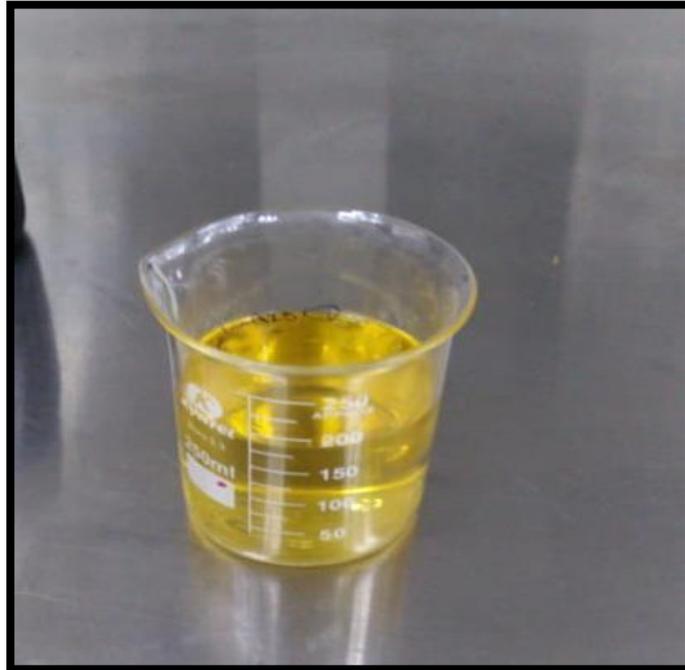


FOTO N° 3 Prueba de solubilidad

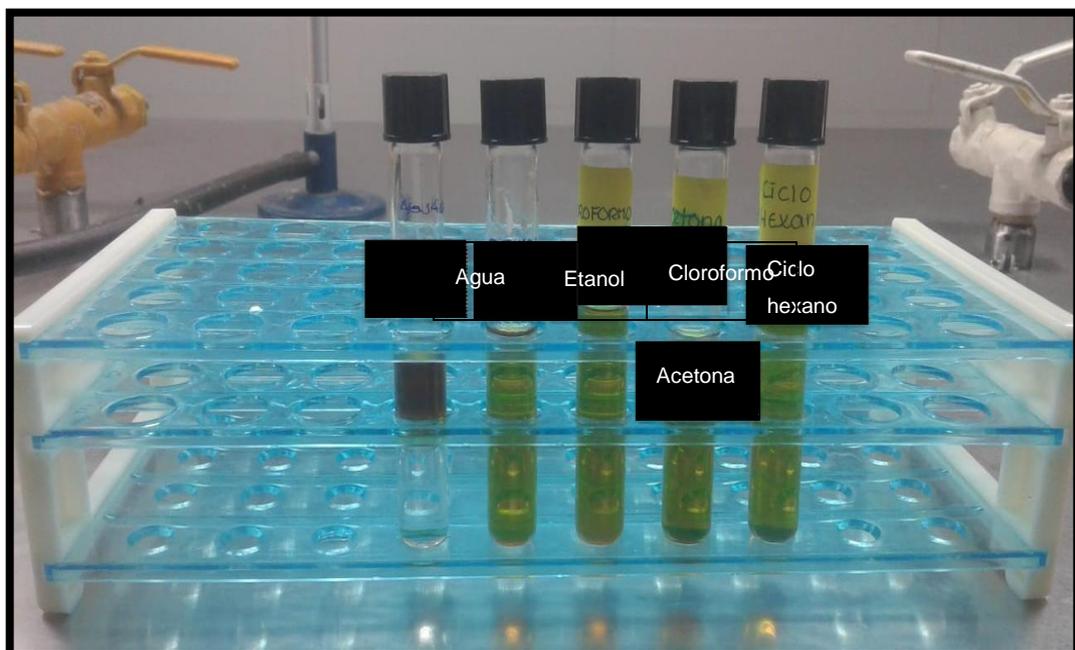


FOTO N° 4 Tamizaje Fitoquímico, identificación de metabolitos secundarios

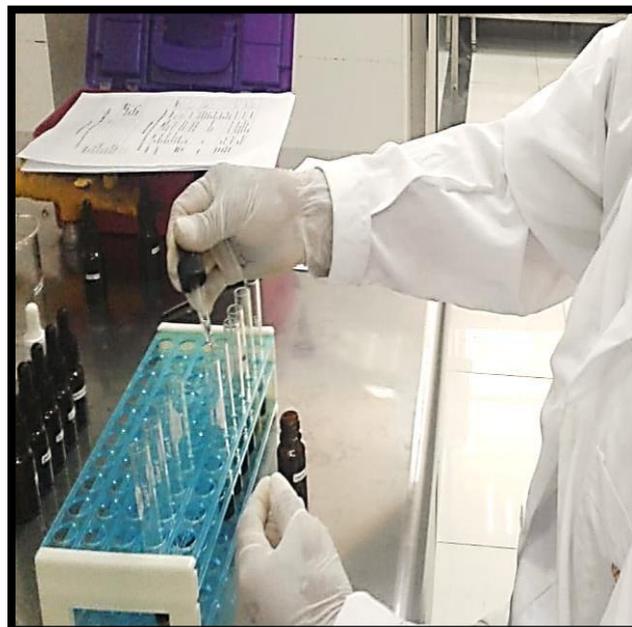
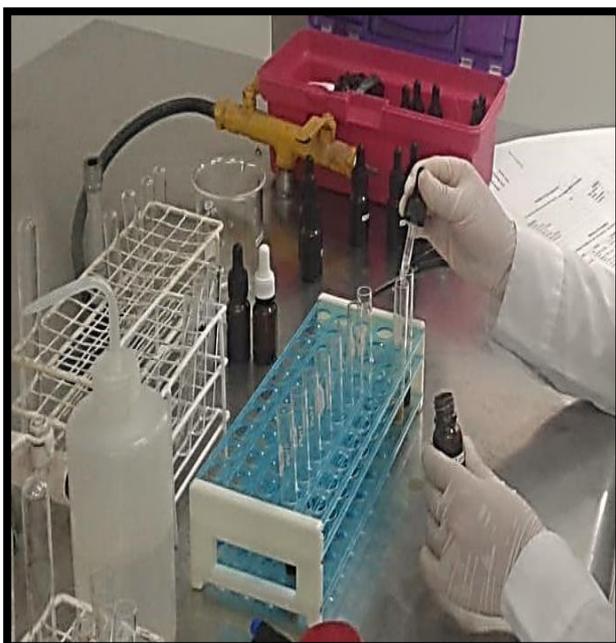


FOTO N° 5 Preparación del estándar (0,5 mc. farland) para el inóculo



TUBO	Cl <sub>2</sub> Ba 1%	SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 1%	u.f.c/ml
1	0,1	9,9	3,0x10 <sup>8</sup>
2	0,2	9,8	6,0x10 <sup>8</sup>
3	0,3	9,7	9,0x10 <sup>8</sup>
4	0,4	9,6	1,2x10 <sup>9</sup>
5	0,5	9,5	1,5x10 <sup>9</sup>
6	0,6	9,4	1,8x10 <sup>9</sup>
7	0,7	9,3	2,1x10 <sup>9</sup>
8	0,8	9,2	2,4x10 <sup>9</sup>
9	0,9	9,1	2,7x10 <sup>9</sup>
10	1,0	9,0	3,0x10 <sup>9</sup>

FOTO N° 6 Preparación del agar Mueller hinton



FOTO N° 7 Siembra de la cepa *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 y Aplicación de los discos.



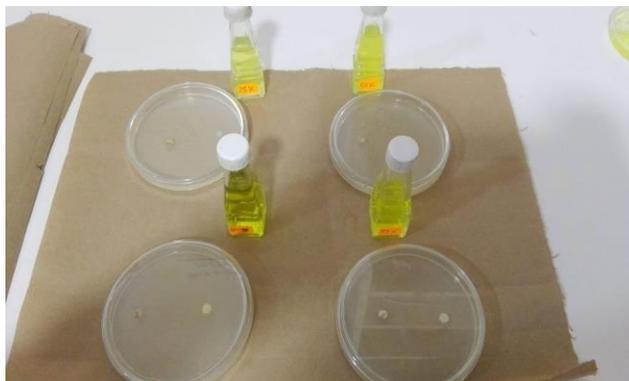
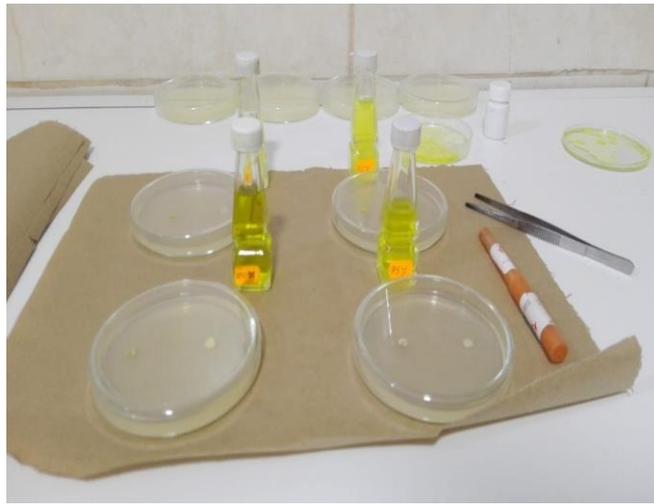
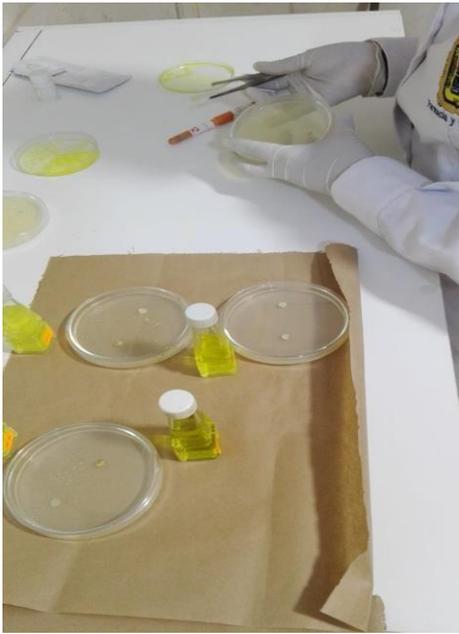
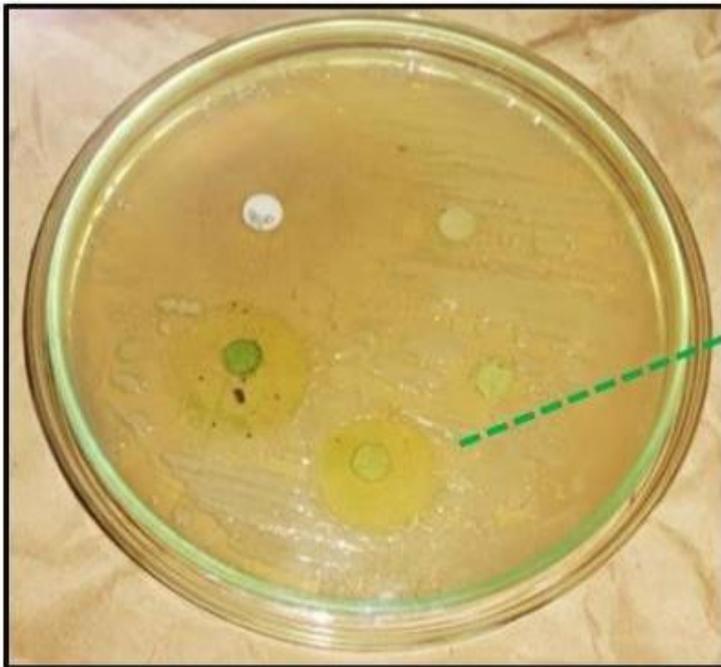
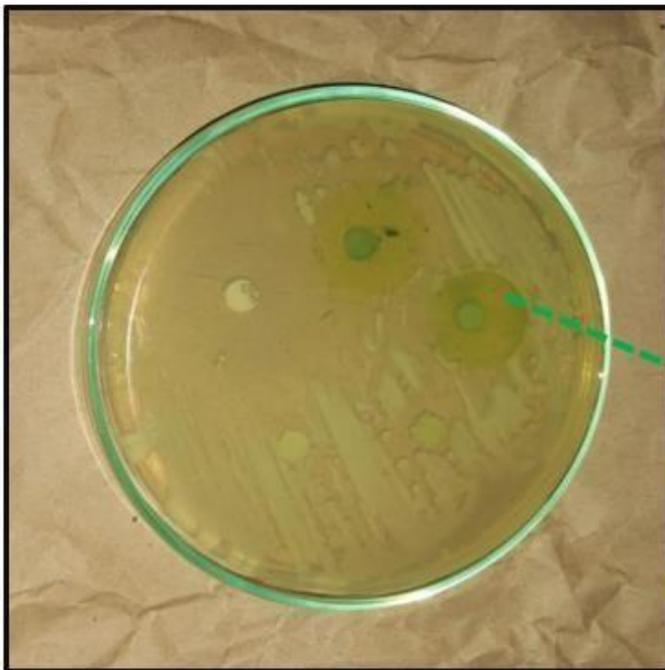


FOTO N° 8 Halos de inhibición del extracto etanólico de *Citrus x limon* (Limón)



Halo de inhibición  
en concentración  
del 75% 24 Hrs.



Halo de inhibición  
en concentración  
del 75% 48 Hrs.



Halo de inhibición  
en concentración  
del 75% a 72 Hrs.  
Con el control  
positivo.