



---

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES  
CHIMBOTE

**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL  
DE *Citrus Limon* (LIMÓN) AL 75% y 100% SOBRE CEPAS  
DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 Y *Streptococcus  
sanguis* ATCC 10556 TRUJILLO, 2018**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
CIRUJANO DENTISTA**

**AUTOR**

**ROMERO CASTILLO, YEIMY JANNY**

**ORCID: 0000-0002-2062-9012**

**ASESOR**

**HONORES SOLANO, TAMMY MARGARITA**

**ORCID: 0003-0723-3491**

**TRUJILLO – PERU**

**2020**

**1. Título de la tesis**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL  
DE *Citrus Limon* (LIMÓN) AL 75% y 100% SOBRE CEPAS  
DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 Y *Streptococcus  
sanguis* ATCC 10556 TRUJILLO, 2018**

## **2. Equipo de trabajo**

### **AUTOR**

Romero Castillo, Yeimy Janny

ORCID: 0000-0002-2062-9012

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Estudiante de Pregrado,  
Trujillo, Perú

### **ASESOR**

Honores Solano, Tammy Margarita

ORCID: 0000-0003-0723-3491

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Facultad de Ciencias  
De La Salud, Escuela Profesional de Odontología, Trujillo, Perú

### **JURADO**

Pairazamán García, Juan Luis

ORCID: 0000-0001-8922-8009

Morón Cabrera, Edwar Richard

ORCID: 0000-0002-4666-8810

Córdova Salinas, Imer Duverli

ORCID: 0000-0002-0678-0162

### **3. Hoja de Firma del jurado y asesor**

---

Mgtr. Pairazamán García, Juan Luis  
Presidente

---

Mgtr. Morón Cabrera, Edwar Richard  
Miembro

---

Mgtr. Córdova Salinas, Imer Duverli  
Miembro

---

Mgtr. Honores Solano, Tammy Margarita  
Asesor

#### **4. Agradecimiento**

A DIOS por haberme acompañado y guiado durante toda mi carrera, por cada día en el que me permitió despertar no solo con vida si no también permitió continuar con salud y desempeño; por darme fuerza para superar dificultades y obstáculos durante el trayecto de mi vida.

A mis padres por apoyarme incondicionalmente durante toda mi carrera, por la paciencia y amor que me tienen, por los valores que me han inculcado para ser mejor persona cada día. Sobre todo por ser un gran ejemplo de vida a seguir.

A mis hermanas que cada día con sus consejos y apoyo lograron que culmine esta etapa importante en mi vida, gracias por llenar mi vida de grandes momentos familiares.

A mi gran amor Leonardo, te agradezco por tanta ayuda y tantos aportes no solo para el desarrollo de mi tesis, sino también para mi vida; por estar en las buenas y en las malas y brindarme tu amor incondicional, eres mi inspiración y mi motivación.

A la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, por permitirme culminar mi carrera con éxito, y haberme brindado tantas oportunidades y crecer en conocimiento

Al mi asesor el Dr. César Abraham Vásquez Plasencia y Dra. Tammy Honores Solano por haberme guiado en la elaboración de este trabajo de investigación, y brindado el apoyo para desarrollarme profesionalmente y seguir cultivando mis valores.

## Dedicatoria

A Dios Por permitirme llegar con salud a la culminación de mi carrera, brindándome además su infinito amor y bondad.

A mis padres Jovita y Andrés, por sus consejos, por sus valores, por ser el pilar fundamental en todo lo que estoy logrando como profesional y como persona, todo esto se lo debo a ellos.

A mis hermanas Michele y Rosa, por apoyarme con espíritu alentador y estar siempre conmigo.

A ti mi amor Leonardo por permanecer a mi lado durante la realización de mi proyecto, por brindarme tu amor incondicional y apoyarme cuando más lo necesitaba.

## 5. Resumen

El objetivo de la investigación fue comparar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus limon* sobre cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556. La muestra estuvo constituida por cepas estándar de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 utilizando 30 placas Petri reactivándolas en Caldo (BHI). Así mismo se preparó el aceite esencial en concentraciones de 75% y 100%. La evaluación del efecto antibacteriano se realizó en 10 repeticiones por concentración, mediante el método Kirby-Bauer, utilizando discos de papel filtro colocado en placas con contenido de Agar Müller Hinton inoculadas con *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, empleando como control positivo clorhexidina al 0.12% y control negativo SSEF/TWEEN 80. Se realizó la medida de halos de inhibición en cada disco dando como resultado lo siguiente: para *Streptococcus mutans* ATCC 25175 el diámetro promedio fue 17.4mm al 75%, 28.3mm al 100%, para clorhexidina al 0.12% fue 24.5mm y para SSEF/Tween 80 fue 0; en *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 el diámetro promedio fue de 20mm al 75%, 30.8mm al 100%, para la clorhexidina al 0.12% fue 15.4mm y para SSEF/Tween 80 fue 0. La prueba ANOVA demostró que existe diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones, y con el test DUNCAN encontramos que al 100% tiene mayor efecto en ambas. Se concluye que el aceite antibacteriano al 100% tiene efecto sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, y esto sugiere un potencial uso terapéutico en la prevención de caries.

**Palabras claves:** Antibacteriano, clorhexidina, *Streptococcus mutans*.

## Abstract

The objective of the research was to compare the antibacterial effect of the essential oil of Citrus limon on *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 strains. The sample consisted of standard strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 using 30 Petri dishes reactivated. in Caldo (BHI). Likewise, the essential oil was prepared in concentrations of 75% and 100%. The evaluation of the antibacterial effect was carried out in 10 repetitions per concentration, by means of the Kirby-Bauer method, using filter paper discs placed in plates with content of Müeller Hinton Agar inoculated with *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, using as positive control 0.12% chlorhexidine and negative control SSEF / TWEEN 80. The inhibition halos were measured in each disc, resulting in the following: for *Streptococcus mutans* ATCC 25175 the average diameter was 17.4mm at 75%, 28.3mm at 100%, for 0.12% chlorhexidine it was 24.5mm and for SSEF / Tween 80 it was 0; in *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 the average diameter was 20mm at 75%, 30.8mm at 100%, for chlorhexidine at 0.12% it was 15.4mm and for SSEF / Tween 80 it was 0. The ANOVA test showed that there is a statistical difference ( $p < 0.05$ ) in the concentrations, and with the DUNCAN test we found that at 100% it has a greater effect on both. It is concluded that the 100% antibacterial oil has an effect on *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, and this suggests a potential therapeutic use in caries prevention.

**Key words:** Antibacterial, chlorhexidine, *Streptococcus mutans*.

## 6. Contenido

1. Portada.....	i
2. Equipo de trabajo.....	ii
3. Hoja de firma del jurado y asesor.....	iii
4. Hoja de agradecimiento.....	iv
Hoja de dedicatoria.....	v
5. Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
6. Contenido.....	viii
7. Índice de gráficos, tablas, cuadros .....	ix
I.    Introducción.....	1
II.   Revisión de la literatura.....	3
III.  Hipótesis.....	23
IV.  Metodología.....	24
4.1. Diseño de la investigación.....	24
4.2. Población y muestra.....	24
4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores.....	27
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	28
4.5. Plan de Análisis.....	33
4.6. Matriz de consistencia.....	35
4.7. Principios éticos.....	37
V.   Resultados.....	39
5.1. Resultados.....	39
5.2. Análisis de resultados.....	45
VI.  Conclusiones.....	48
Aspectos complementarios.....	49
Referencias bibliográficas.....	50
Anexo.....	57

## 7. Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> al 75% y 100%, control positivo y control negativo sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 Trujillo, 2018.....	39
<b>Tabla 2.</b> Efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> al 75% y 100%, control positivo y control negativo sobre cepas de <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC. Trujillo, 2018 .....	40
<b>Tabla 3.</b> Comparación del Efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> al 75% y 100%, control positivo y control negativo sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 Trujillo, 2018.....	41
<b>Tabla 4.</b> Comparación del Efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Citrus Limon</i> al 75% y 100%, control positivo y control negativo sobre cepas de <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC Trujillo, 2018.....	43

## Índice de Gráficos

**Gráfico N° 1** Efecto antibacteriano de dos concentraciones y los controles positivo y negativo del aceite esencial *Citrus limon* sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

.....42

**Gráfico N° 2** Efecto antibacteriano de dos concentraciones y los controles positivo y negativo del aceite esencial *Citrus limon* sobre cepas de *Streptococcus sanguis* ATCC 10556

.....44

## Índice de Cuadros

<b>Cuadro N° 1.</b> Taxonomía del limón.....	19
<b>Cuadro N° 2.</b> Componentes del <i>Citrus limon</i> (Limón).....	22
<b>Cuadro N° 3.</b> Concentraciones de preparación del aceite esencial de limón.....	29
<b>Cuadro N° 4.</b> Resultados.....	67

## I. Introducción

La caries dental es una enfermedad bucal, localizada y transmisible; originada por diferentes factores. Así mismo presenta diferentes mecanismos que propician variedad de patologías. Actualmente, la OMS reporta a nivel mundial el índice de caries dental es del 60% a 90% en escolares y casi el 100% de adultos, según el Minsa, a nivel nacional el índice de caries dental en la población infantil es del 85%.<sup>1</sup>

El factor microbiano es de suma importancia para la formación de la caries en la cavidad oral, dentro de su etapa inicial encontraremos una conversión de bacterias anaeróbicas facultativas Gram (+) y en su transcurso predominarán las bacterias anaeróbicas estrictas Gram(+) y Gram(-); dentro de ellas los primeros colonizadores son el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556.<sup>2</sup>

El limón es un pequeño árbol se le atribuye distintas propiedades dentro de ellas propiedades antibacterianas. Estrada E. en el 2017 determinó que el aceite esencial del limón en concentraciones altas tiene un potencial efecto antibacteriano contra la cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), también algunos estudios como el de Da Silva en el 2015 determinó que el limón tiene un efecto antibacteriano frente a *Streptococcus aureus*, Por ello el objetivo del estudio fue de comparar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus limon* (Limon) al 75% y 100% sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556). Este estudio fue de tipo Cuantitativo, diseño experimental, longitudinal, prospectivo y analítico.<sup>3,4</sup>

Se buscó con este estudio explorar alternativas naturales con menos secuelas y a bajos costos, ya que la cáscara constituye una pérdida para la industria, por ello este estudio ayudará a aprovechar este recurso y de esa manera incentivar la economía local.

En la investigación se determinó la existencia de una gran diferencia significativa en las concentraciones utilizadas en cada bacteria, formando mayor halo al 100% con un promedio de 28.3mm, al 75% con un promedio de 17.4mm contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y para *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 formando mayor halo al 100% con un promedio 30.8mm y al 75% con un promedio de 20mm. Se concluyó que el aceite esencial citrus limón al 100% presenta mayor efectividad frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556.

## II. Revisión de la literatura

### 2.1. Antecedentes

#### Antecedentes internacionales

Espinel A.<sup>5</sup> (Ecuador, 2020). “Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tres especies de *Citrus limon* contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*”. El objetivo de la investigación fue: Evaluar la efectividad antibacteriana de los aceites esenciales del limón contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El efecto antibacteriano se determinó al extraer aceite esencial de las tres variedades de *Citrus limón*, donde se comparó con antibióticos comerciales. Se aplicó un diseño Completamente al Azar DCA con arreglo factorial A (tres especies de limón) x B (tres dosis de aceites esenciales) + 3 testigos (total 12 tratamientos). La comparación de medias se realizó mediante el test de Tukey ( $p < 0.05$ ). El resultado obtenido revela que *C. aurantifolia* presentó un mejor control para *S. aureus*, ( $1 \times 10$  UFC), mientras que *C. lantifolia* lo fue para *E. coli* ( $1 \times 10$  UFC). En conclusión los aceites esenciales del limón poseen actividad antibacteriana.

Argote F, et al.<sup>6</sup> (Colombia, 2017). “Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*”. El estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto antibacteriano de los siguientes aceites esenciales: eucalipto, limón y

mandarina frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. El efecto antibacteriano se determinó con la concentración mínima inhibitoria CMI y bactericida CMB, con el método de micro dilución, con una emulsión estable la medida promedio de gota estuvo entre 40 y 63 micras. La determinación de la composición se dio por cromatografía de gases acoplado a masas, se realizó la medición de la densidad, índice de refracción y acidez. Se obtuvo como resultado en los aceites valores de densidad entre  $0,858\pm 0,002$  y  $0,920\pm 0,003$  g/cm<sup>3</sup>, índice de refracción de  $1,469\pm 0,01$  y  $1,4595\pm 0,0025$ , índice de acidez entre  $5,32\pm 0,02$  y  $8,08\pm 0,074$ ; la composición de limón y mandarina presentaron compuestos comunes como limoneno, terpineno, octanal y mirceno; en eucalipto se destacaron eucaliptol (1,8 cineol) y pineno. En conclusión, los mejores resultados de inhibición fueron para eucalipto, limón y mandarina frente a la bacteria Gram positiva con una CMI y CMB de  $6,8 \mu\text{L/mL}$  y para la Gram negativa el aceite esencial de cáscara de mandarina y eucalipto con una CMI y CMB de  $13,2 \mu\text{L/mL}$ .

Da Silva A.<sup>7</sup> (Bolivia, 2015), “Determinación de la actividad antibacteriana de tres variedades de limón (*Citrus limón* (L) *Osbeck*, *Citrus limón* (L) *Osbeck* en combinación con *Citrus reticulata* y *Citrus medica* L) Frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*”, se realizó un estudio cuyo objetivo fue determinar la actividad antibacteriana de tres variedades de limón (*citrus limon* (L), *Osbeck*,

*Citrus limon* (L) *Osbeck* en combinación con *Citrus reticulata* y *Citrus medica* L) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* donde se obtuvo el aceite esencial y el macerado de la hoja cáscara y de la semilla del limón. Se obtuvo como resultado frente a *Streptococcus aureus* el aceite y el macerado de la hoja; por ende la cáscara si presenta actividad antibacteriana menos en la semilla, por otro lado en la variedad *Citrus limón* (L) *Osbeck* en combinación con *Citrus reticulata* (L) existe un efecto antibacteriano en la cáscara y en el macerado frente a *Escherichia coli* no presenta actividad antibacteriana.

Liu Y, et al.<sup>8</sup> (China, 2014), “Efecto del aceite de limón cítrico sobre el crecimiento y la adhesión de *Streptococcus mutans* ATCC 25175”, teniendo como objetivo explotar nuevos agentes anticariógenos, investigando los efectos del aceite de limón cítrico (CLO), sobre el crecimiento y la adherencia de las bacterias cariogénicas orales primarias *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Donde se exploró con un ensayo de microdilución el efecto inhibitor del crecimiento. Analizaron la adherencia mediante recuentos de colonias en las superficies respectivas y la tasa de inhibición de la adherencia (AIR). Se utilizó PCR en tiempo real para investigar los efectos de la CLO en la transcripción de los genes que codifican la glucosiltransferasa (Gtf), gtfB, C y D. El método de Neson-Somogyi se usó para medir los efectos de la CLO en la actividad de la Gtf. La concentración

inhibitoria mínima de CLO contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fue de 4,5 mg / ml. La CLO redujo efectivamente la adherencia de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en la superficie de vidrio (el AIR fue de 98.3 a 100%,  $P > 0.05$ ) y la superficie del esmalte recubierto de saliva (el AIR fue de 54.8 a 79.2%,  $P < 0.05$ ). La CLO redujo efectivamente la actividad de Gtf y la transcripción de gtf's de una manera dependiente de la dosis ( $P < 0.05$ ). En conclusión, CLO puede inhibir eficazmente el crecimiento y la adherencia a las superficies de esmalte recubiertas de vidrio y saliva de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. También puede inhibir la transcripción de gtf's, así como la actividad de la enzima Gtf.

### **Antecedentes Nacionales**

Estrada E.<sup>9</sup> (Cusco, Perú, 2017). “Efectividad antibacteriana in vitro del aceite esencial *Citrus limon* en diferentes concentraciones sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175”, su objetivo fue determinar el efecto antibacteriano In Vitro del aceite esencial del limón en diferentes concentraciones (50%, 75% y 100%) sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175”, para ello el método fue el empleo de Agar Mueller Hinton como el medio de cultivo mediante la técnica de difusión. La medición de los halos de inhibición fue entre 24, 48 y 72 horas en cuatro periodos de instalación para poder determinar su efecto antibacteriano para ello se utilizó la escala de Duraffourd. El diámetro de los halos de inhibición fue de 6.50 mm al 50%, 13.57 mm

al 75%, 14.78 mm al 100% con el aceite esencial Citrus Limón, Los resultados obtenidos fueron que al 75% y 100% muestra su efectividad antibacteriana, pero en la contracción de 50% su efecto antibacteriano es nulo frente al *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM que se realizó con la escala de Duraffourd en cuatro periodos de instalación. La medida de halos de inhibición fue de 6.50 mm al 50%, 13.57 mm al 75%, 14.78 mm al 100% para el aceite esencial *Citrus limon*, donde se demostró que al 75% y 100% presenta efectividad antibacteriana como sensible (+) y muy sensible (++) . Como resultado este estudio determinó que el aceite esencial *Citrus limon* a la concentración del 50%, la efectividad antibacteriana fue nula (-) frente al *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM. En conclusión bajo la evaluación de los tres tiempos utilizando el aceite esencial *Citrus limon* al 75%, se aprecia que hay un crecimiento significativo del halo inhibitorio superior a lo observado al 100%.

Mendoza A, et al.<sup>10</sup> (Cusco, Perú, 2016). “Efectos antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de: *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cimbopogon citrus* (Hierba Luisa), *Origanum vulgare* (Orégano), *Citrus aurantifolia swingle* (Limón) y *Citrus sinesis* (Naranja), frente a Cepas estandarizadas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175”, el objetivo que tiene es de evaluar el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de: *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cimbopogon citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Citrus aurantifolia*

*swingle* (Limón) y *Citrus sinensis* (Naranja), con el del Gluconato de Clorhexidina al 0.12% sobre cepas estandarizadas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Para realizar este estudio se utilizó el método de destilación por arrastre a vapor de agua y se obtuvo los aceites esenciales de cada planta. Para la realización microbiológica se utilizó los cinco aceites esenciales mencionados a una concentración del 100 %; como medios de cultivos se emplearon Agar Müeller Hinton enriquecido con 5% de sangre humana; éstos aceites fueron comparados con un patrón control que fue el Gluconato de Clorhexidina al 0.12%. Se realizó tres repeticiones para cada tipo de aceite esencial grupo utilizando placas de Agar Müller Hinton con el método Kirby Bauer o método de difusión de discos donde se colocó 10 ul de cada aceite esencial y del patrón control sobre las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Para determinar la actividad antibacteriana se midió el diámetro de los halos de inhibición a las 24 horas. La medida de halos de inhibición para el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) fue de 32.967 mm al 100 %, en el caso de aceite esencial de *Origanum vulgare* (Orégano) fue un halo de inhibición 15.889 mm al 100 %, para el aceite esencial de *Foeniculum vulgare* (Hinojo) fue un halo de inhibición de 15 mm al 100 %, en el aceite esencial de *Citrus sinensis* (Naranja) fue un halo de inhibición de 14.667 mm al 100 %, por otro lado el aceite de *Citrus aurantifolia swingle* (Limón) tuvo un halo de inhibición de 9.333 mm al 100 %. Al realizar el estudio de ANOVA de POST HOC se aclaró

que hay disconformidad significativa en los diámetros de los halos de inhibición, y en prueba de HSD de TUKEY se reconoce que el aceite esencial fue el más objetivo. El resultado obtenido fue que los aceites esenciales de *Cimbopogon citrus* (Hierba Luisa), *Origanum vulgare* (Orégano), *Foeniculum vulgare* (Hinojo) y *Citrus sinensis* (Naranja) presentan mayor efectividad antibacteriana sobre las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, mientras que el aceite esencial *Citrus aurantifolia* swingle (Limón) su efecto antibacteriano es nula.

### **Antecedentes Locales**

Alvares A.<sup>11</sup> (Trujillo, Perú, 2018). “Efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *Citrus latifolia tanaka* “limón” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 comparado con oxacilina: un estudio in vitro”, su objetivo fue de analizar el efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *citrus latifolia tanaka* " limon" en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 en comparación con la oxacilina en concentración de 1ug en un estudio in vitro; se colocaron cuatro diluciones al 100%, 75%, 50% y 25%. Las cepas se cultivaron en agar Muelle Hinton, en el la prueba de sensibilidad se realizó con el método de kirby-Bauer. Como resultado se observa un halo inhibitorio en todas las diluciones: al 25% se logra diferencia un halo inhibitorio de 11.50 mm (DS 0.71±0.2 IC95%: de 10.99 a 12.01, entre intervalos de 10 a 12 mm), al 50% 13.20 mm (DS 1.03±0.33 IC95%: de 12.46 a 13.94, entre intervalos de 12 a 15 mm), al 75% 13.90 mm (DS 0.74±0.23 IC95%: de 13.37 a 14.43, entre intervalos de 13 a 15

mm) y al 100% 16.00 mm (DS 1.33  $\pm$ 0.42 IC95%: de 15.05 a 16.95, entre intervalos de 14 a 18 mm); superando los valores inhibitorios del CLSI ( $\geq$ 13 mm) en concentraciones de 75% y 100%. La oxacilina logro un halo inhibitorio de 26.60 mm (DS 0.52 $\pm$ 0.16 IC95%: de 26.23 a 26.97, entre intervalos de 26 a 27mm). Con el tipo de análisis estadístico ANOVA (0.000), con el tipo de test Tukey que indican el estudio resultado altamente significativo y que a mayor sea el nivel de concentración del aceite esencial, mayor será el efecto antibacteriano, pero se a su vez no logro superar al efecto de la oxacilina. Logramos concluir que el aceite esencial del *Citrus latifolia tanaka* “limon” es antibacteriano pero tiene menos eficacia que la oxacilina.

Tan M.<sup>12</sup> (Trujillo, Perú, 2015), “Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon* (limón) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente”, su objetivo fue evaluar el efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de cáscara de Citrus limón (limón) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y de esa manera se compara con la efectividad antimicrobiana de vancomicina, para ello se realizó la preparación de un extracto utilizando la cáscara de Citrus limón en cuatro medidas: 5%(50 mg/ml), 25%(250 mg/ml), 50%(500mg/ml) y 75%(750mg/ml). Para la determinación de la efectividad antimicrobiana de *C. limon*, se expuso a *S.aureus* meticilino resistente a las cuatro concentraciones del extracto etanólico, con el método de Kirby – Bauer (difusión en

disco), se comparó con el control vancomicina, obteniendo como resultado que *S.aureus* meticilino resistente, arrojó sensibilidad a cuatro concentraciones del extracto etanólico, al comparar los halos de inhibición según la escala de Duraffourd. Así mismo, la efectividad antibacteriana inhibitoria promedio de la vancomicina sobre *S. aureus* meticilino resistente corresponde a la categoría sumamente sensible para dar como finalizado este estudio se determinó que la cascara de *Citrus limon* (limón) sí tiene efecto inhibitorio in vitro sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, pero es significativamente inferior al compararlo con vancomicina.

Quintana A.<sup>13</sup> (Trujillo, Perú, 2014). “Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y de *Citrus limon* en la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Su objetivo es de evaluar efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” y *Citrus limon* “limón” en la sobrevivencia de *S. aureus* y *E. coli* in vitro”. Se utilizó el método de destilación por arrastre con vapor de agua para la extracción de los aceites esenciales. Se determinó la fase logarítmica media de *E. coli* y *S. aureus* que fue de 6 y 10 horas respectivamente. Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se utilizó el método de macrodilución en caldo para lo cual se usó caldo nutritivo más Twen 80 al 0.5%, posteriormente se agregó los aceites esenciales de *C. citratus* y *C. limon*; se inoculó 20 uL de la suspensión bacteriana equivalente al tubo N° 0.5 del

nefelómetro de Mac Farland,  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. Como resultado se obtuvo CMI de *C. citratus* frente a *S. aureus* de 0.10 uL/mL, y la CMI de *C. citratus* frente a *E. coli* de 0.80 uL/mL. La CMI de *C. limon* frente a *S. aureus* de 0.80 uL/mL y la CMI de *C. limón* frente a *E. coli* de 1.80 uL/mL. En conclusión El aceite esencial de *C. citratus* y *C. limón* tienen un efecto inhibitorio en la sobrevivencia de *S. aureus* y *E. coli*.

## 2.2 Marco Teórico

### 2.2.1. Caries Dental

A nivel mundial, es la patología oral con mayor prevalencia y una enfermedad infecciosa que pasa por un proceso de desgaste del tejido duro del diente, causado por el metabolismo bacteriano, provocando una pérdida neta de minerales y en algunos casos dará como resultado la presencia de una cavidad. En la cavidad oral existen numerosas especies de bacterias que debido a su función, interacción y propiedades forman parte del biofilm dental. Para la patogénesis de la caries dental encontraremos varios microorganismos, dentro de ellos tenemos al *Streptococcus* del grupo *mutans* ya que es de suma importancia como agente asociado a ella.<sup>14</sup>

Para la formación de una lesión cariosa existen múltiples factores, pero principalmente son: huésped (dientes y saliva), microflora (infecciones bacterianas) y sustrato (dieta cariogénica); y tiempo. Es importante que sean favorables las condiciones de cada uno de los factores para que se forme la lesión cariosa.<sup>15</sup>

La alimentación cumple un papel muy importante para la aparición de la caries dental, principalmente en individuos de alto riesgo. El consumo elevado de carbohidratos fermentales, y la falta de utilización de flúor prevalece a la formación de caries dental. Sin embargo hay una íntima relación de la malnutrición proteico-calórica y la caries, el falta de vitaminas (A, D), calcio y fósforo estas provocarían cambios en la formación dentaria y retardo en la erupción. En la malnutrición proteico-calórica existe con frecuencia en los países de vías de desarrollo, se ha revelado un descenso de Inmunoglobulina A en la saliva, lo que podría incrementar la aparición de caries dental.<sup>16</sup>

Existe una relación muy íntima entre la aparición de caries dental y la ingesta de azúcares. Las características de consistencia, textura y adhesión de los alimentos con azúcar, y la manera de cómo se ingiere, son más importantes para la determinación de su capacidad cariogénica. Las causas que determinan la capacidad cariogénica de los alimentos con azúcar son:

1. Solidez de los alimentos: tienden a ser más cariogénicos los alimentos adhesivos que los no retentivos. Por ejemplo, un refresco con azúcar que fue tomada de forma rápida tendrá menor cariogenicidad que un chicle o dulce, ya que no importó la cantidad de azúcares de cada uno.<sup>17</sup>
2. Tiempo de la deglución: los alimentos azucarados que se consumen entre las comidas tendrán mayor cariogenicidad. Influye el mecanismo de protección natural de la cavidad oral, para que funcione mucho más durante las comidas y se encargue de los desechos de los restos de alimentos; compensando los ácidos (capacidad *buffer*) que se hayan podido formar. Por esta razón, el caso de comer alimentos cariogénicos antes de ir a dormir y no higienizarse, la capacidad buffer no realizara su función, porque durante las horas de sueño la cavidad oral estará en reposo.<sup>17</sup>
3. La continuidad: El consumo de sacarosa disminuye en poco tiempo el pH del biofilm y esta va a facilitar la desmineralización del tejido duro del diente y por lo tanto favorece en la formación de la lesión cariosa, mientras más frecuente sea más cariogénicos se vuelven.<sup>17</sup>

### **2.2.1.1. Microorganismos Cariogénicos**

Existe variedades de bacterias en la boca, especialmente del género *Streptococcus* y especie *mutans*, asociadas a la caries dental, con sus serotipos *sanguis*, *sobrinus* y *crictetus*, c, e y f. Los estreptococos tienen forma de coco que van creciendo en parejas, movimiento y formación de esporas ausente, y presencia de coloración Gram positiva. El *Streptococcus mutans* ATCC 25175, es el primer colonizador en el diente y de mayor aislamiento en lesiones cariosas humanas. Cambia su forma, será un coco o de apariencia alargada, por esa razón es el nombre que tiene.<sup>17</sup>

### **2.2.1.2. Factores de Virulencia**

La virulencia de un organismo es su capacidad de daño y su característica específica es lo que lo hace ser patógeno, por consiguiente causa una enfermedad. En el caso del *Streptococcus mutans* ATCC 25175, con mayor implicancia para la formación de la caries dental son:

- a) Acidogenicidad: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dispone los azúcares y de esa manera elabora el ácido láctico, como resultado del metabolismo final. Por lo tanto disminuye el pH y así produce la desmineralización del esmalte dental.<sup>17</sup>
- b) Aciduricidad: En pH bajo tiene como objetivo elaborar ácido.<sup>16</sup>
- c) Acidofilicidad: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 puede tolerar el medio ácido por consiguiente lejos de la célula se bombean protones.<sup>17</sup>

- d) Síntesis de fructanos y glucanos: A partir de la sacarosa es que se producen el glucano y el fructano. El glucano que es insoluble se unirá a la pieza dentaria y será utilizado de depósito de nutrientes.<sup>17</sup>
- e) Síntesis de glucógeno (polisacáridos intracelulares): si durante un tiempo no se consume azúcar, el glucógeno trabajará como un repuesto sosteniendo así la producción de ácido.<sup>17</sup>
- f) Fabricación de dextranasa: mueve las reservas de energía y regula la actividad de las glucosiltransferasas moviendo de esta manera resultado final de glucano.<sup>17</sup>

### **2.2.2. *Streptococcus mutans* ATCC 25175**

Cuando la lesión cariosa progresa, existe conversión de bacterias anaeróbicas facultativas Gram (+), estas predominarán el inicio de la destrucción del tejido dentario, a bacterias anaeróbicas estrictas Gram (+) y Gram (-) que destacan en caries dental evolucionadas. Aun no se conoce los factores que definen esta sucesión microbiota. La asociación de bacterias con el desarrollo de la lesión cariosa mencionamos: *Streptococcus*, son cocos anaeróbicos facultativos Gram (+), formándose en cortas cadenas de 4 a 6 cocos, su diámetro es de 0,5 a 0,8 µm, formando parte de la flora microbiana siendo patógenos oportunistas para la caries dental y la endocarditis infecciosa. En la boca, el de mayor estudio es el *Streptococcus mutans* ATCC 25175, entre sus factores de patógenos destacan:

- a. Es acidófilo, acidúrico y acidógeno.
- b. Sintetización de glucanos solubles e insolubles y fructanos.
- c. Síntesis de glucógeno.

- d. Tiene potencial adhesivo debido a su proteína salival, facilitando se adhiera a un área dura carente de glucano, con potencial coagregativa y agregativa mediante una proteína receptora de glucano, glucosiltransferasa y mutano.
  - e. Elaboración de bacteriocina con actividad en diferentes microorganismos.
- La capacidad de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 es de sintetizar glucanos insolubles, a partir de la sacarosa de la dieta, a través de las glucosiltransferasas, ayuda con la formación de la biopelícula dental.<sup>18</sup>

La determinación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 si participa al inicio de la caries, es debido a varios estudios en animales para experimentar, sobresaliendo el estudio de 1960 de Keyes y Fitzgerald, evidenciaron a esta bacteria en caries experimental en hamsters, como un agente microbiano criogénico. En 1994, Van Houte, señala que el *Streptococcus mutans* tiene una mayor proporción de flora cultivable.<sup>18</sup>

#### **2.2.2.1. Adhesión de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y formación inicial de la caries dental**

La cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 es de fenotipo homogéneo. Pero, en recientes investigaciones se ha demostrado que existe un mayor nivel de bioquímica, genética y heterogeneidad serológica. La heterogeneidad serológica se encuentra a nivel de enzimas que son producidas por varias especies de *Streptococcus mutans*. El procedimiento de valor para evaluar grupos de varios tipos de *Streptococcus* e inmunológicos, es la serotipificación.<sup>4</sup>

Se ha confirmado que la glucosiltransferasa del *Streptococcus mutans*, desempeña un papel crítico en el crecimiento de virulencia de la placa dentobucal. La glucosiltransferasa se adsorbe, produciendo glucano en el esmalte, favoreciendo a una matriz insoluble para que se forme placa y que colonicen los microorganismos.<sup>4</sup>

#### **2.2.2.2. Coagregación**

*Streptococcus mutans* ATCC 25175 tiene la aptitud de pegarse a superficies, asegura adherirse con otros estreptococos y con bacterias de otras especies. Muchas cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se aglutinan (adherencia homóloga) por la adición de dextranos de alto peso molecular. También se ha reportado que ciertas cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 forman agregados con *Nocardia*, *Neisseria* al igual que con *Candida albicans* (adherencia heteróloga). Existe complejidad en los procesos e implican una variedad de componentes bacterianos y de factores externos como la dieta especialmente el consumo de sacarosa que puede influir también en la proporción de las distintas especies bacterianas que constituyen la película, la cual es fermentada por *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *C. albicans*, produciendo un entorno acidogénico favorable para ambos.<sup>4</sup>

#### **2.2.3. *Streptococcus Sanguis* ATCC 10556**

El *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, pertenece a la familia de Streptococcaceae de género *Streptococcus*, el nombre de la especie fue dada

por White y Niven en 19441, a los estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos, aislados de la sangre de pacientes con endocarditis subaguda<sup>19</sup>

### 2.2.3.1 Taxonomía

**Cuadro N° 1**  
**Taxonomía**

<b>Reino</b>	Bacteria
<b>Filo</b>	Fermicutes
<b>Clase</b>	Bacili
<b>Orden</b>	Lactobacillales
<b>Familia</b>	Streptococcacea
<b>Genero</b>	Streptococcus
<b>Especie</b>	S. sanguis

El *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 es uno de los primeros colonizadores en la formación de la placa dental y es comúnmente encontrarla en pacientes con endocarditis bacteriana.<sup>19</sup>

### 2.2.3.2. Morfología y estructura

- **Macroscópicamente:** En medio de agar sangre las colonias formadoras se observan cortas, de colores verdes grisáceos y traslúcidos.
- **Microscópicamente:** Se observan cocos Gram (+) de diámetro de 0,6 hasta 2  $\mu$ m, agrupadas en parejas largas y medianas. El gen de *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 es de ADN circular, constando de 2.388.435 pb.<sup>19</sup>

### **2.2.3.3. Factores de virulencia:**

Fimbrias y adhesinas: las bacterias se unen al biofilm dental a través de estructuras proteicas.

Es competente con *Streptococcus mutans* ATCC 25175, inhibiéndola mediante la producción de peróxido de hidrogeno.<sup>19</sup>

### **2.2.3.4. Fisiopatología**

Se ha encontrado más de 700 distintas bacterias, como el *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 encontrándose en la cara del diente y encía. Coloniza la boca entre los 6 a 12 meses de vida y pionero en adherirse a la superficie dentaria limpia. El *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 produce la enzima glucosiltransferasa, responsable de la sintetización del glucano por ello hidrolizará a la sacarosa transfiriendo de restos de glucosa a polímeros de glucanos preexistente.<sup>19</sup>

### **2.2.3.5. Aislación del *Streptococcus sanguis* ATCC 10556**

Se emplean muestras de la biopelícula dental de la cara vestibular del diente anterior, previamente diluida en solución salina al 0,9 %, se siembra 100 µL en placas de agar mitis salivarius. Estas serán incubadas por 48 horas en un medio anaeróbico. Concluido el tiempo se observarán pequeñas colonias bien adheridas al agar, para lograr una lectura bien detallada se observará por microscopia esteroscópica.<sup>19</sup>

#### 2.2.4. *Citrus limon* (Limon)

Procedente de lugares tropicales y subtropicales del archipiélago de Malayo y en Asia; de ahí que se distribuyen a nivel mundial donde actualmente se siembran cítricos.<sup>20</sup>

Su centro de origen (*C. limon*. Burmann) es desconocido, pero su hipótesis reside en la hibridación de la lima con la sidra.<sup>20</sup>

- **Descripción botánica:** Árbol de tamaño mediano y espinoso. Sus flores de color blanco a púrpura y su parte central, rojo. Sus hojas son ovaladas de bordes aserradas y con terminaciones en punta. Su fruto maduro es de color amarillo, de forma ovalada y con 8 a 10 segmentos.<sup>20</sup>
- **Distribución:** Proveniente de Asia de la parte Sur-Este. Cultivada en toda la Amazonía.<sup>20</sup>

##### 2.2.4.1. Clasificación Taxonómica:

En 1997 Mabberley determinó una clasificación de los principales citrus, simplificando y aclarando el género, por lo cual está aprobado por los principales botánicos.<sup>20</sup>

- Reino/División: Plantae/Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
  1. Subclase/Orden: Rosidae/Sapindales
- Familia: Rutaceae

- Subfamilia/Tribu: Citroideae/Citreae
- Género: Citrus<sup>20</sup>

#### 2.2.4.2. Composición del *Citrus limon* (Limón)

Químicamente: Componentes de *Citrus limon* (limón). (Cuadro N°2).<sup>21</sup>

Cuadro N° 2

<i>CITRUS LIMON</i>
Terpeno
Limoneno
Sabineno
$\alpha$ Pineno, $\beta$ pineno, <i>p</i> -cimeno, terpineno

#### 2.2.4.3. Propiedades terapéuticas del limón

##### 2.2.4.3.1. Fruto

- **Problemas de la garganta:** cada 4 horas se debe de realizar gárgaras utilizando el zumo de limón en un vaso con agua agregándole una pequeña cantidad de sal.
- **Sangrado nasal:** Se coloca dos gotas de zumo de limón en la cavidad nasal donde se encuentra el sangrando.
- **Caracha:** Se hierve el zumo de limón hasta que tenga una consistencia espesa y oscura, luego aplicar con un el jugo sobre la «caracha», previo a ello se debió de haber limpiado

con agua y jabón, se repite hasta que desaparezca una vez diaria.

- **Resfríos:** La mitad de un limón se debe hervir para añadirle «Vic-vaporub»; después se cubre con una toalla para inhalar el vapor por un lapso de 10 minutos.
- **Heridas:** Para la disminución del dolor e inflamación se debe exprimir limones asados sobre la herida. El zumo de limón fresco es como un desinfectante cuando es aplicado sobre la herida.<sup>21</sup>

### **III. Hipótesis**

El aceite esencial de *Citrus limón* (Limón) al 100% tiene mayor efecto antibacteriano que el de 75% sobre *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556)

## **IV. Metodología.**

### **4.1. Diseño de la investigación.**

Este trabajo de investigación presentó un diseño:

- Experimental: El investigador intervino sobre una variable para modificar un resultado, con fines de observar una relación causal.<sup>21</sup>
- Longitudinal: Se realizó un seguimiento a los mismos sujetos de estudio por un largo periodo de tiempo, esto permitió ver la evolución de características y variables observadas.<sup>22</sup>
- Prospectivo: El inicio del estudio es anterior a los hechos estudiados, los datos se recopilan a medida que se van obteniendo.<sup>22</sup>
- Analítico: porque se diseñó para evaluar asociaciones entre resultados, identificando las posibles causas del efecto.<sup>22</sup>

### **4.2. Población y muestra**

#### **Población**

La población estuvo constituida por cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556

## Tamaño de Muestra

Para definir el tamaño de muestra en el presente estudio se utilizará la siguiente fórmula:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2s^2}{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^2}$$

Dónde:

$Z_{\alpha/2} = 1.96$ ; valor de la distribución normal para un  $\alpha = 0.05$

$Z_{\beta} = 0.84$ ; valor de la distribución normal para un  $\beta = 0.20$

$S = 0.8 (\bar{x}_1 - \bar{x}_2)$  el cual es un valor asumido por no estar completa la información sobre los parámetros de la variable de interés en estudios similares.

Luego Reemplazando obtenemos:

$$n = 10 \text{ repeticiones}$$

Luego la muestra estuvo conformada por  $n = 10$  repeticiones por 08 grupos, los grupos experimentales serán: 6 grupos y 2 grupos control:

- Aceite 75% - *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- Aceite 75% - *Streptococcus sanguis* ATCC 10556
- Aceite 100% - *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- Aceite 100% - *Streptococcus sanguis* ATCC 10556
- Aceite 75% - *Streptococcus mutans* ATCC 25175 vs *Streptococcus sanguis* ATCC 10556

- Aceite 100% - *Streptococcus mutans* ATCC 25175 vs *Streptococcus sanguis* ATCC 10556
- Clorhexidina 0.12% control positivo - *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- Clorhexidina 0.12% control positivo - *Streptococcus sanguis* ATCC 10556
- SSEF/Tween 80 control negativo - *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- SSEF/Tween 80 control negativo - *Streptococcus sanguis* ATCC 10556

### **Criterios inclusión y exclusión**

#### **Inclusión**

- Se utilizó frutos en buen estado
- Medio de cultivo libre de contaminantes
- Cepa certificada como cultivo

#### **Exclusión**

- Se rechazó los frutos en mal estado
- Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 que no hayan sido correctamente refrigeradas antes de ser activadas.

### 4.3. Definición y operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definiciones operacionales	Indicadores	Valores finales	Tipos de variables	Escala de medición
Efecto antibacteriano sobre <i>Streptococcus mutans</i> . ATCC 25175	Acción de un producto antibacteriano contra microorganismo s. <sup>10</sup>	Se determinó por medio de la medición de halos de inhibición mediante método Kirby-Bauer	Diámetro del halo de inhibición	mm	Cuantitativa	Razón
Efecto antibacteriano sobre <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556	Acción de un producto antibacteriano contra microorganismo s. <sup>10</sup>	Se determinó por medio de la medición de halos de inhibición mediante método Kirby-Bauer	Diámetro del halo de inhibición	mm	Cuantitativa	Razón
Aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (limón)	Resultado del proceso de extracción del principio activo de los componentes de la cáscara del limón para obtener el aceite esencial. <sup>9</sup>	Se utilizó dos concentraciones de aceite esencial <i>Citrus limon</i> utilizada.	Concentración del aceite esencial	75% 100%	Cualitativa	Ordinal

#### **4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

4.4.1 Técnica: Observación microbiológico

4.4.2 Instrumento: Cáscara de limón

##### **4.4.2.1. Protocolo para la obtención del aceite esencial del limón**

La especie de *Citrus limon* “limón”, se recolectó 25 kilos de limón en Chalacala Alta S/N Piura Sullana Sullana, luego el fruto fue trasladado a la ciudad de Trujillo para ser procesado en el laboratorio de la UNT. Para una precisa identificación del material botánico fue llevado al Herbario Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo bajo el Código N° 60467. (Ver Anexo N° 3)

##### **4.4.2.2 Obtención de los aceites esenciales**

La obtención de los aceites esenciales de *Citrus limon* “limón”, se realizó por el método de “hidrodestilación”<sup>22, 23</sup>

Se seleccionaron los frutos en buenas condiciones y se desechó aquellos que estaban contaminados por hongos. Luego se lavaron con agua potable y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5%. Posteriormente se enjuagó el fruto con agua destilada estéril, esto es para retirar los residuos de hipoclorito. Luego se peló los limones y se trabajó con las cáscaras del fruto para extraer los aceites esenciales.<sup>23</sup>

Posteriormente se armó el equipo de destilación, sometiendo la muestra a una corriente de vapor de agua sobrecalentada, arrastrando la esencia que posteriormente por acción del refrigerante, será condensada. El

destilado se separó tomando en cuenta sus propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, por el cual se utilizó una pera de separación de vidrio, deshidratándose las impurezas de agua en el aceite esencial con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Finalmente se filtró, y se guardó en un frasco de vidrio color ámbar (para evitar la descomposición por la luz) y bajo refrigeración a una temperatura de 4°C.<sup>23</sup>

#### 4.4.2.3 Preparación de las diferentes concentraciones de los aceites esenciales

Las concentraciones se prepararon según el siguiente cuadro:

<b>Cuadro N° 3</b>	<b>Volumen de aceite</b>	<b>Volumen de Tween 80</b>	<b>Volumen final</b>	<b>Concentración (%)</b>
	7.5 mL	2.5 mL	10 mL	75
10 mL	-	10 mL	100	

Luego, se colocó cada una de las concentraciones en frascos de vidrio de color ámbar, para protegerlas de la luz, llevándolas posteriormente a refrigeración a 4°C, hasta la realización del análisis microbiológico.<sup>22,23</sup>

#### **4.4.2.4 Procedimientos y protocolos de experimentación**

Evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus limon* (Limón) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556.<sup>24</sup>

##### **4.4.2.4.1 De la obtención de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556**

Las cepas liofilizadas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 fueron obtenidas directamente del laboratorio Gen Lab. (Ver Anexo N° 3)

##### **4.4.2.4.2. Reactivación de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556**

Para este estudio se utilizó cultivo liofilizado de las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, la reactivación se realizó sembrando cada cepa liofilizada en matraz con 50 ml de Caldo Brain Heart Infusion (BHI) o Cerebro Corazón Infusión, luego se incubó a 37°C por 24 – 48 horas en condiciones de microaerofilia.<sup>24</sup>

Se verificó si tiene cultivo puro, para lo cual se sembró por estría en Agar TSYB para *Streptococcus mutans* e incubará a 37°C por 24 – 48 horas en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se eligió una colonia compatible con *Streptococcus* para realizar coloración

gram.<sup>23</sup> A partir de una colonia se sembró en caldo BHI y en Agar Tripticasa Soya (TSA), y se conservó hasta su posterior empleo.<sup>24</sup> Para *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 se verificó si se tiene cultivo puro, para lo cual se sembró por estría en agar Sangre e incubará a 37°C por 24 – 48 horas en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se eligió una colonia compatible con *Streptococcus* para realizar coloración gram.<sup>23</sup> A partir de una colonia se sembró en caldo BHI y en Agar Tripticasa Soya (TSA), y se conservó hasta su posterior empleo.<sup>24</sup>

#### **4.4.2.4.3. Preparación de las concentraciones del aceite esencial de *Citrus limon* (Limón)**

A partir del aceite esencial de *Citrus limon* (Limón) se preparó las concentraciones de 75% y 100%.<sup>24</sup>

#### **4.4.3. De la determinación de la sensibilidad antimicrobiana**

La evaluación del efecto antibacteriano, se realizó mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar.<sup>25</sup>

Para lo cual se procedió de la siguiente manera:

##### **a) Estandarización del inóculo de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556**

La cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 mantenidas en Caldo BHI se sembró en Agar TSA, e incubó bajo condiciones de microanaerobiosis a 37°C durante 24 horas. Luego de 24 horas, de las placas con *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se escogen 3 a 4 colonias y se diluyó en caldo BHI o solución salina

fisiológica estéril hasta obtener una turbidez semejante al tubo número 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland ( $1.5 \times 10^8$  ufc/mL). Se procedió de la misma manera para *Streptococcus sanguis* ATCC 10556.<sup>25,26</sup>

**b) Inoculación de las placas**

***Streptococcus mutans* ATCC 25175**

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo ( $1.5 \times 10^8$  ufc/ml), se tomó una alícuota de 100µl y se colocó en cada una de las placas con Agar Müeller Hinton, con un hisopo estéril sumergido en la suspensión, luego se distribuye la suspensión bacteriana en tres direcciones para asegurar una uniformidad del inóculo en la placa. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.<sup>26</sup>

***Streptococcus sanguis* ATCC 10556**

Se procedió de la misma forma para *Streptococcus mutans* ATCC 25175

**c) Preparación de los discos con aceite esencial de *Citrus limon* (Limón)**

Se preparó discos de papel filtro whatman número 3 estériles, los cuales fueron embebidos con 50 ul de cada una de las concentraciones de 75% y 100% del aceite esencial de *Citrus limon* (Limón).<sup>26</sup>

Luego, con una pinza estéril, se colocó los discos sobre las placas de agar Müeller Hinton (AMHG) inoculadas con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y en placas con agar Mueller Hinton inoculadas con la cepa *Streptococcus sanguis* ATCC 10556.<sup>26</sup>

Se empleó como control positivo Digluconato de clorhexidina al 0.12% y como control negativo agua destilada estéril.

**d) Incubación:**

Se incubó las placas en posición invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos, a 37°C durante 24 y 48 horas en micro anaerobios se utilizó jarra Gaspak y con el método de la vela.

**4.4.4. Lectura de los resultados**

Después del tiempo de incubación 24 a 48 horas se examinó cada placa, se midieron los diámetros (mm) de los halos de inhibición del crecimiento alrededor de cada disco, para ello se utilizó regla milimetrada, abarcando el diámetro del halo.<sup>26</sup>

Se realizarán 10 repeticiones de cada ensayo.<sup>26</sup>

**4.4.5. Manejo de desechos**

Al finalizar la investigación, después de que las cajas han sido leídas van al autoclave de material sucio, ahí se esterilizó a 121° C por 15 minutos a una atmósfera de presión.

**4.5. Plan de análisis.**

Para analizar la información se construyeron tablas de una entrada con sus valores absolutos y con sus medias y desviaciones estándar además de gráficos para presentar los resultados de la investigación.

Para comparar el efecto antibacteriano del aceite esencial *Citrus limon* sobre las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556

aplicamos la prueba ANOVA para demostrar si existe diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones; las pruebas estadísticas se harán teniendo en cuenta un nivel de significancia del 5%.

Se contó con el apoyo de una hoja de cálculo de Microsoft Excel y el programa estadístico Minitab.

#### 4.6. Matriz de consistencia

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Población y Muestra
<p>¿Cuál es el efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (Limón) al 75% y 100% sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 y <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556 Trujillo 2018?</p>	<p><b>Objetivo General:</b> Comparar, el efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (Limón) al 75% y 100% sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 y <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556</p> <p><b>Objetivos Específicos:</b></p> <p>I. Evaluar, el efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (Limón) al 75% sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 Trujillo 2018</p> <p>II. Evaluar, el efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (Limón) al 75% sobre cepas de <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556 Trujillo 2018</p> <p>III. Evaluar, el efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (Limón) al 100% sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 Trujillo 2018</p>	<p>El aceite esencial de <i>Citrus limón</i> (Limón) al 100% tiene mayor efecto antibacteriano que el de 75% sobre <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguis</i> (ATCC 10556)</p>	<p>Efecto antibacteriano</p> <p>Aceite esencial del <i>Citrus limon</i></p>	<p>La población estuvo conformada por cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 y cepas de <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556</p> <p>La muestra estuvo conformada por n = 10 repeticiones por 08 grupos, los grupos experimentales serán: 6 grupos y 2 grupos control</p>

	<p>IV. Evaluar, el efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (Limón) al 100% sobre cepas de <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556 Trujillo, 2018</p> <p>V. Comparar, el efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (Limón) al 75% y 100% con el digluconato de clorhexidina al 0.12%, sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 Trujillo, 2018</p> <p>VI. Comparar, el efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (Limón) al 75% y 100% con el digluconato de clorhexidina al 0.12%, sobre <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556 Trujillo, 2018</p>			
--	---	--	--	--

#### 4.7. Principios éticos

Este estudio se realizó con cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 dentro de un laboratorio siguiendo el protocolo del laboratorio de la Universidad Nacional de Trujillo y bajo los principios éticos de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote ULADECH como:

a) Justicia: Esta investigación procede con juicio razonable y también tiene cautela necesaria para demostrar que las capacidades y conocimientos garanticen prácticas justas. Este estudio fue in vitro por ende las concentraciones utilizadas aún no se sabe si en un futuro estudio con personas pueda producir algún efecto adverso ya que se trabajó en laboratorio.<sup>27</sup>

b) Integridad científica:

El investigador debe regirse bajo la integridad y rectitud de la actividad científica en función de las normas deontológicas de nuestra profesión, se evalúan y declaran daños, riesgos y beneficios potenciales que puedan afectar a quienes participen en la investigación. Es una investigación in vitro, se utilizó porcentajes estándares, no fue usado en personas, por lo tanto no puedo afirmar que pueda ser efectivo en ellas, Los resultados son precisos y científicamente comprobados. No existen conflictos de intereses financieros ni personales que puedan influir inapropiadamente en el desarrollo de esta investigación.<sup>27</sup>

c) Cuidado del medio ambiente y la diversidad:

Al finalizar la investigación, se procedió a eliminar los desechos que se han producido durante el estudio. Después de que las cajas fueran leídas van al autoclave de material sucio, ahí se esterilizó a 121° C por 15 minutos a una atmosfera de presión.<sup>27</sup>

Se siguió el protocolo bajo el reglamento del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la UNT.<sup>28</sup>

## V. Resultados

### 5.1. Resultados

**Tabla 1**

Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus limon* (Limón) al 75% y 100%, control positivo y control negativo sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Grupo de tratamiento	n	Promedio	Desv. Estándar	p*
Aceite esencial de <i>Citrus limon</i> al 75%	10	17.4	0.516	
Aceite esencial de <i>Citrus limon</i> al 100%	10	28.3	1.494	0.0000
Clorhexidina 0.12%	10	24.5	0.707	
SSEF/Tween 80	10	0	0	

p\*: prueba ANOVA

Nivel de significancia estadística (p<0.05)

Fuente: Datos proporcionados por el investigador

#### Interpretación:

La concentración que mayor halo promedio registra es el obtenido con la concentración al 100% de aceite de *Citrus limon* (28.3 mm), superando inclusive al obtenido con Clorhexidina 0.12% (24.5 mm).

El análisis de varianza de los tratamientos muestra que existen diferencias muy altamente significativas entre los efectos antibacterianos de los tratamientos (p < 0.001)

**Tabla 2**

Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus limon* (Limón) al 75% y 100%, control positivo y control negativo sobre *Streptococcus sanguis* ATCC 10556. ULADECH sede Trujillo – 2018

Grupo de tratamiento	n	Promedio	Desv. Estándar	p*
Aceite esencial de <i>Citrus limon</i> al 75%	10	20	1.563	
Aceite esencial de <i>Citrus limon</i> al 100%	10	30.8	2.098	0.0000
Clorhexidina 0.12%	10	15.4	0.516	
SSEF/Tween 80	10	0	0	

p\*: prueba ANOVA

Nivel de significancia estadística (p<0.05)

Fuente: Datos proporcionados por el investigador

**Interpretación:**

La concentración que mayor halo promedio registra es el obtenido con la concentración al 100% de aceite de *Citrus limon* (30.8 mm), le sigue el obtenido por la concentración al 75% (20.0 mm) superando ambos al obtenido con Clorhexidina 0.12% (15.4 mm).

Tabla 2, el análisis de varianza de los tratamientos muestra que existen diferencias muy altamente significativas entre los efectos antibacterianos de los tratamientos (p < 0.001)

**Tabla 3**

Comparación del Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus limon* (Limón) al 75% y 100%, control positivo y control negativo sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Grupos de Tratamiento	n	Subconjunto para $\alpha= 0.05$			
		1	2	3	4
SSEF/Tween 80	10	0			
Aceite esencial de <i>Citrus limon</i> al 75%	10		17.4		
Clorhexidina 0.12%	10			24.5	
Aceite esencial de <i>Citrus limon</i> al 100%	10				28.3

Nivel de significancia estadística ( $p<0.05$ )

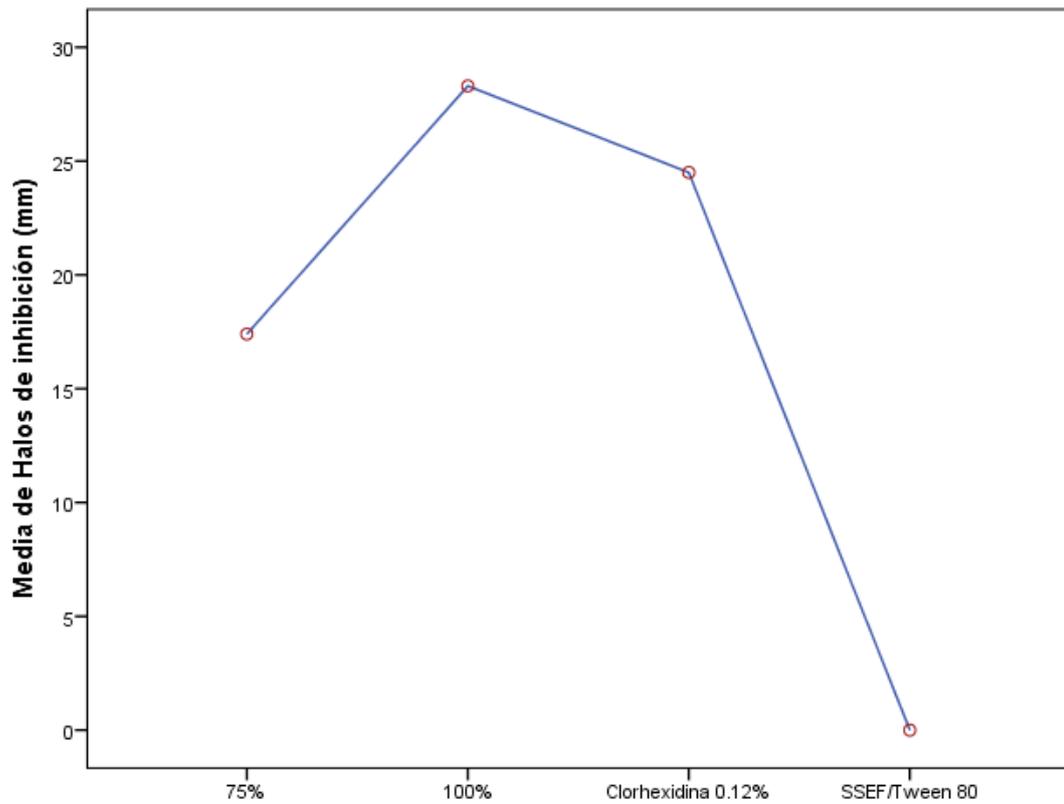
Fuente: Datos proporcionados por el investigador

### Interpretación:

La prueba de comparaciones múltiples de Duncan muestra que el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus limon* 100% es mejor inclusive al obtenido con Clorhexidina 0.12%, y le sigue el efecto antibacteriano obtenido con aceite de Citrus 75%.

### Gráfico N°1

**Gráfico N° 1** Efecto antibacteriano de dos concentraciones y los controles positivo y negativo del aceite esencial *Citrus limon* sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175



**Tabla 4**

Comparación del Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus limon* (Limón) al 75% y 100%, control positivo y control negativo sobre *Streptococcus sanguis* ATCC 10556.

Grupos de Tratamiento	n	Subconjunto para $\alpha= 0.05$			
		1	2	3	4
SSEF/Tween 80	10	0			
Clorhexidina 0.12%	10		15.4		
75%	10			20	
100%	10				30.8

Nivel de significancia estadística ( $p<0.05$ )

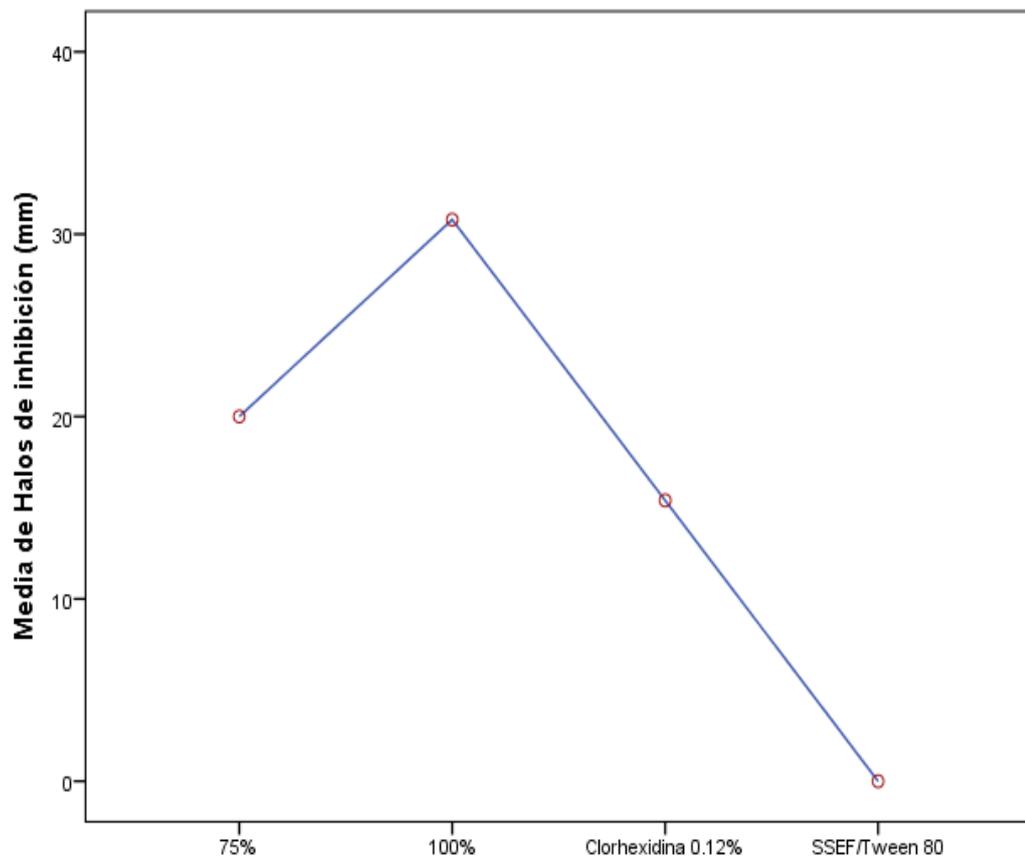
Fuente: Datos proporcionados por el investigador

**Interpretación:**

La prueba de comparaciones múltiples de Duncan muestra que el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus limon* 100% es mayor a todos los tratamientos, le sigue el efecto antibacteriano obtenido con aceite de *Citrus limon* 75% que supera inclusive al obtenido con Clorhexidina 0.12%.

## Grafico N°2

**Gráfico N° 2** Efecto antibacteriano de dos concentraciones y los controles positivo y negativo del aceite esencial *Citrus limon* sobre cepas de *Streptococcus sanguis* ATCC 10556



## 5.2 Análisis de resultados

En la presente investigación de tipo experimental, *in vitro*, se comparó el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus limon* (Limón) al 75% y 100% sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556). Los resultados demostraron que existe una gran diferencia significativa en las concentraciones utilizadas para cada bacteria, se concluyó que es más susceptible a la concentración al 100% donde se obtiene mayor halo de inhibición que el de 75% y la clorhexidina al 0.12%. Esto se debe a que el aceite esencial de *Citrus limón*, penetran las membranas bacterianas y de esa manera interrumpe las propiedades funcionales de esta, interactúa con organelos del citoplasma de la célula de la bacteria y va a interferir en el metabolismo de esta. La característica importante del aceite esencial es la hidrofobicidad, que permitirá separar los lípidos de la membrana celular y de esa manera hacerlas permeables. La unión del aceite esencial de *Citrus limon* con la membrana celular microbiana permite la inhibición del crecimiento de algunas bacterias Gram positivas que son más susceptibles que las gram negativas que son más resistentes debido a que posee una pared celular exterior hidrofílica, que previene la penetración de compuestos hidrofóbicos.<sup>13</sup>

Por otro lado la naturaleza fenólica del aceite esencial también provoca una respuesta antimicrobiana frente a bacterias patógenas; los compuestos fenólicos pueden alterar la permeabilidad celular microbiana, dañar las membranas citoplasmáticas, interferir con la energía celular en el sistema de generación de ATP e interrumpir la fuerza motriz de protones, con la permeabilidad alterada de la membrana citoplasmática se puede provocar la muerte celular.<sup>11</sup> Aunque no hay

antecedentes con la cepa *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, encontramos otros antecedentes como el de Liu Y, et al.<sup>8</sup> que realiza su investigación con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, quien pertenece al mismo grupo, y efectivamente el aceite esencial *Citrus limon* tiene efecto antibacteriano contra los primeros colonizadores de la placa dental y caries dental.

Esto confirmaría el estudio realizado por Estrada E.<sup>9</sup> quien mostró resultados semejantes, utilizando el mismo método para la extracción del aceite esencial y la reactivación de la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175, trabajó con 3 concentraciones 50%, 75% y 100%, obteniendo como resultado que el 75% y 100% si presentaron efectividad antibacteriana ante la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175 al igual que el estudio realizado por Liu Y, et al.<sup>8</sup> quienes mostraron el efecto antibacteriano del aceite de limón sobre el crecimiento y la adherencia de las bacterias cariogénicas orales primarias siendo el principal *Streptococcus mutans* ATCC 25175 uno de los primeros colonizadores para la formación de la caries dental, por el cual lograron inhibirla. En estos resultados nos damos cuenta que el aceite esencial *Citrus limon* tiene una alta efectividad antibacteriana

Por otro lado confirmaría la investigación por Argote F, et al.<sup>6</sup> quienes estudiaron la efectividad antibacteriana del aceite esencial *Citrus limon* en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los resultados demostraron que los aceites esenciales de eucalipto, cascara de limón y mandarina tienen capacidad inhibitoria para dichas bacterias, al igual que los estudios de Quintana A.<sup>13</sup> y Espinel A.<sup>5</sup> quienes confirmarían que efectivamente el aceite esencial *Citrus limón* tienen un efecto

inhibitorio en la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Por otro lado Da Silva A.<sup>7</sup> quien utilizó no solo aceite esencial de la cáscara, si no también utilizó un macerado de la hoja y la semilla frente a las bacterias gram positiva y gram negativa este estudio da como resultado el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus limon* frente a las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, pero en el macerado no se encontró ninguna efectividad antibacteriana.

Es importante también conocer si actúa de la misma forma el aceite esencial *Citrus limon* contra algunos medicamentos como lo hizo Alvares A.<sup>11</sup> quien comparó la efectividad antibacteriana del aceite esencial de la cáscara del con oxacilina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 utilizando concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% formando un mayor halo con 16mm en la concentración del 100% y la oxacilina un halo de inhibición de 26.60mm, demostrando que el efecto del aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* “limón” es antibacterian, pero tiene menos efecto que la oxacilina, en el estudio que realizo Tan M.<sup>12</sup> de igual manera comparó a la vancomicina con el extracto etanólico de cáscara de *Citrus limon* (limón) sobre *Staphylococcus aureus*, donde se determina que la cáscara de *Citrus limon* (limón) sí tiene efecto inhibitorio in vitro sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, pero es significativamente inferior al compararlo con vancomicina.

## VI. Conclusiones

1. El efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus limon* (Limón) 100% presentó mayor efecto antibacteriano que el de 75% frente a sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguis* ATCC 10556.
2. El aceite esencial de *Citrus limon* (Limón) al 75% presentó efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
3. El aceite esencial de *Citrus limon* (Limón) al 75% presentó efecto antibacteriano sobre *Streptococcus sanguis* ATCC 10556.
4. El aceite esencial de *Citrus limon* (Limón) al 100% presentó efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
5. El aceite esencial de *Citrus limon* (Limón) al 100% presentó efecto antibacteriano sobre *Streptococcus sanguis* ATCC 10556.
6. El aceite esencial de *Citrus limon* (Limón) al 100% comparado con el digluconato de clorhexidina al 0.12% presentó mayor efectividad antibacteriana, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
7. El aceite esencial de *Citrus limon* (Limón) al 100% comparado con el digluconato de clorhexidina al 0.12% presentó mayor

efectividad antibacteriana, sobre *Streptococcus sanguis* ATCC 10556.

### **Aspectos complementarios**

Se recomienda:

1. Desarrollar estudios del efecto antibacteriano del aceite esencial *Citrus limón* frente a otros tipos de bacterias referentes a odontología.
2. Hacer estudios de comparación del aceite esencial *Citrus limon* contra fármacos de uso odontológico
3. Realizar estudios donde se evalúe el efecto antibacteriano de aceites esenciales contra la cepa de *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, ya que no existen muchos estudios con esa bacteria.

## Referencias bibliográficas

1. Palomer L. Caries dental en el niño: Una enfermedad contagiosa. Rev. Chil. Pediatr. [Internet]. 2006 Feb [citado 2018 Jun 17] ; 77( 1 ): 56-60. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0370-41062006000100009&lng=es](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062006000100009&lng=es).
2. Figueroa M, Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. Rev. Odont Ven [Internet]. 2008 Jun [citado 2018 June 18]; 4 ( 1 ): 14. Disponible en: [https://www.actaodontologica.com/ediciones/2008/1/microorganismos\\_progresion\\_lesion\\_caries\\_dental.asp](https://www.actaodontologica.com/ediciones/2008/1/microorganismos_progresion_lesion_caries_dental.asp) Fundación Acta Odontológica Venezolana
3. Gonzales N, Lopez C. Efecto de la liberación de *Ceraeochrysa cincta* sobre el control de insectos picadores-chupadores en el cultivo de Mango (*Mangifera indica L*) y Limonero (*Citrus aurantifolia* swingle), en Jayanca distrito de Lambayeque. [Tesis pregrado]. Lambayeque. Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo”; 2017
4. Ojeda J, Oviedo E, Salas A. Streptococcus mutans and dental caries. CES Odontol. [Internet]. 2013 Jan [cited 2018 June 18] ; 26( 1 ): 44-56. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-971X2013000100005&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000100005&lng=en).
5. Espinel A. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tres especies de *Citrus limon* contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. [Tesis]. Ecuador. Universidad Agraria del Ecuador; 2020 [Citado el 01 de setiembre de

2020]. Disponible en:

<https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/ESPINEL%20OBREGOSO%20ANDREA%20JUDITH.pdf>

6. Argote F, Suarez- Z, Tobar E, Perez A, Hurtado M, Delgado J. Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*. Rev.Bio.Agro [Tesis]. 2017 Dec [cited 2019 June 13] ; 15(spe2 ): 52-60. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612017000400052&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612017000400052&lng=en). [http://dx.doi.org/10.18684/bsaa\(v15\)ediciónespecialn2.578](http://dx.doi.org/10.18684/bsaa(v15)ediciónespecialn2.578).
7. Da Silva A. Determinación de la actividad antibacteriana de tres variedades de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck, *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación con *Citrus reticulata* y *Citrus medica* L.) Frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*<sup>1</sup>. Univ. Cienc. Soc. [revista en la Internet]. 2015 Mayo [citado 2018 Jun 17] ; (14): 30-38. Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S8888-88882015000100006&lng=es](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S8888-88882015000100006&lng=es).
8. Liu Y, Zhang X, Wang Y, Chen F, Yu Z, Wang L, Chen S, Guo M.. Effect of citrus lemon oil on growth and adherence of *Streptococcus mutans*. World J Microbiol Biotechnol [Internet] .2014. [quoted 13 June 2019]; 30 (4): 1435. Available in:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=antibacterial+effect+of+lem+oil+against+streptococcus+mutans>

9. Estada A. Efectividad antibacteriana in vitro del aceite esencial Citrus Limón en diferentes concentraciones sobre el *Streptococcus Mutans*. [Tesis]. Cusco. Universidad Andina del Cusco; 2017 [Citado el 18 de junio de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.uandina.edu.pe/bitstream/UAC/1409/1/RESUMEN.pdf>
10. Mendoza A, Baca M, Yábar L, Adriana, Efectos antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de: *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cymbopogon citrus* (Hierba Luisa), *Origanum vulgare* (Orégano), *Citrus aurantifolia* swingle (Limón) y *Citrus sinesis* (Naranja), frente a Cepas estandarizadas de *Streptococcus mutans*, [Tesis]. Cusco. Universidad andina del Cusco; 2016 [Citado el 18 de junio de 2018]. Disponible en: [http://repositorio.uandina.edu.pe/bitstream/UAC/559/3/Liseth\\_Adriana\\_Tesis\\_bachiller\\_2016.pdf](http://repositorio.uandina.edu.pe/bitstream/UAC/559/3/Liseth_Adriana_Tesis_bachiller_2016.pdf)
11. Alvares A. Efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del Citrus latifolia tanaka “limón” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 comparado con oxacilina: un estudio in vitro. [Tesis]. Trujillo: Universidad Cesar Vallejo; 2018 [Citado el 20 de agosto de 2020]. Disponible en: [http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/25651/alvarez\\_ta.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/25651/alvarez_ta.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
12. Tam M. Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de cáscara de *citrus limon* (limón) sobre *staphylococcus aureus* metilino resistente. [Tesis]. Trujillo. Repositorio Universidad Antenor Orrego; 2015 [Citado el 18 de junio de 2018]. Disponible en:

[https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UPAO\\_d80c66fd9d49835e714abb9e6721cd7c](https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UPAO_d80c66fd9d49835e714abb9e6721cd7c)

13. Quintana A. Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y de *Citrus limon* en la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. [Tesis]. Trujillo. Universidad Nacional de Trujillo; 2014 [Citado el 18 de junio de 2018]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4129/Quintana%20Rojas%20Anthony%20Eugenio.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
14. Ojeda-Garcés Juan Carlos, Oviedo-García Eliana, Salas Luis Andrés. *Streptococcus mutans* and dental caries. *CES Odontol*. [Internet]. 2013 Jan [cited 2018 June 20] ; 26( 1 ): 44-56. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-971X2013000100005&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000100005&lng=en).
15. Núñez P, García L. Biochemistry of dental caries. *Rev Haban Cienc Méd* [Internet]. 2010 Jun [citado 2018 Jun 20] ; 9( 2 ):156-166. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2010000200004&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2010000200004&lng=es).
16. González M, González A, González E. Salud dental: relación entre la caries dental y el consumo de alimentos. *Nutr. Hosp*. [Internet]. 2013 Jul [citado 2018 Jun 18] ; 28( Suppl 4 ): 64-71. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112013001000008&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112013001000008&lng=es).

17. Duque J, Pérez A, Hidalgo I. Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2006 Mar [citado 2018 Jun 20]; 43(1): Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75072006000100007&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072006000100007&lng=es).
18. Figueroa M, Alonso, Guillermina; Acevedo A. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. [Internet] 2009 Jun [Citado el 18 de junio de 2018]; 47 (3); 34-37. Disponible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2009/1/art-27/>
19. Donald R, Katherine B. Streptococcus sanguinis y Actinomyces viscosus bacterias pioneras en la formación del biofilm dental. KIRU. [Internet]. 2016 Jun [citado 2018 Jun 20]; 13( 2 ): 179-184. Disponible en: <https://www.aulavirtualusmp.pe/ojs/index.php/Rev-Kiru0/article/view/1014/814>
20. Mejía C, Kember, Rengifo S, Elsa E. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonía peruana 2da Ed. Tarea Asociación Gráfica Educativa. 2000
21. Arriola E. Estudio Preliminar de las Propiedades de la Semilla de Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia swingle*) para su Posible Aprovechamiento. La Serena [revista en la Internet]. 2006 [citado 2018 Jun 21] v. 17(1) 97-102. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-07642006000600015&script=sci\\_arttext&tlng=en](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-07642006000600015&script=sci_arttext&tlng=en)
22. González A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, departamento de Ingeniería Química. Abril- 2004

23. Juárez J, Castro A, Jaúregui J, Lizano J, Carhuapoma M, Choquesillo F, Félix L, Cotillo P, López J, Jaramillo M, Córdova A, Ruíz J, Ramos N. Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (Naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. *CI* [Internet]. 14jun.2010 [citado 25ago.2020];13(1):9-3. Available from: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3157>
24. Centurión V. Efecto antibacteriano en vitro de diferentes concentraciones del extracto etanolico de *Caesalpinia spinosa*(tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668. [Tesis]. Trujillo. Universidad Antenor Orrego. 2015 [Citado el 18 de junio de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.upao.edu.pe/handle/upaorep/972>
25. Clinica Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty third Information Supplement. CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute); M100-S23. 2013. Vol 33(1)
26. Al- Waili, A; Al- Ghamdi, M. Ansari, y Al Salom. Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi- Resistant *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* and *Candida Albicans* Isolates in Single and Polymicrobial Cultures. *Int J Med Sci*. 2012.
27. Universidad Católica los Ángeles de Chimbote. Código de ética para la investigación (Versión 002) [Internet] 23 agosto 2020. Disponible en: <https://www.uladech.edu.pe/images/stories/universidad/documentos/2019/codigo-de-etica-para-la-investigacion-v002.pdf>.

28. Sanders E. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. J Vis Exp (internet). 2012 (consultado el 15 de noviembre del 2019); (63): 3064. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846335/>

# ANEXO N°1

## CERTIFICADO DE ANALISIS DE LIMONES PERUANOS

INSPECTORATE SERVICES PERÚ S.A.C.

Dirección: Jr. Pacto Andino 260-266,  
Urb. Villa-Chorrillos Lima, Perú  
Teléfono: 511 4229000 anexo 2300

PE-RB

5 de mayo de 2017



página 1 de 2

Certificado de Análisis Nro: 81007930 8400683

Cromatografía Líquida LC/MS-MS en  
LIMON

**Encargado por** : AGRO INDUSTRIAS MARP NORSUR SAC  
**Referencia Cliente** : Productor Código: LIMONES PERUANOS SRL; DIRECCION LEGAL: CALLE  
M A D R E D E D I O S 5 9 9  
BELLAVISTA; MUESTREADOR: PRODUCTOR; RESPONSABLE DE LA  
MUESTRA: MARCOS PUICON ZAPATA; Localidad: TAMBOGRANDE-  
PIURA; Predio: FUNDO LIMONES PERUANO; Cuartel: ASOCIACION;  
Muestreado Por: -; Fecha Muestreo: -;

**Muestreado Por** : -  
**Descripción Muestra** : LIMON - - - 1 KG  
**Fecha de Recepción** : 02/may/2017  
**Periodo de Análisis** : 02/may/2017 05/may/2017  
**Método Analítico** : Modular multi method for determining pesticide residues by LC-MS/MS  
in fruits, vegetables, liquids and food including those with high fat  
content as well as substrates and soil (based on QuEChERS) ISP 901  
2016-08

Sustancias Analizadas Lista de sustancias y Límites de Cuantificación - ver página 2

Parámetro	Resultado	Unidad	Límite de Cuantificación
Imidacloprid	0.024	mg/kg	0.005 mg/kg
Procloraz	0.01	mg/kg	0.01 mg/kg

Lidia López Suárez / Karim E. López Bernable  
Jefe de Laboratorio de Pesticidas / Coordinadora de Lab. de Pesticidas

Los resultados de este análisis se refieren únicamente a las materias sometidas al análisis.  
Este resultado de análisis no puede ser reproducido total o parcialmente sin la autorización  
expresa de Inspectorate Services Peru S.A.C.  
No existe ninguna responsabilidad por parte de Inspectorate Services Peru S.A.C. en relación  
proporcionada respecto a los límites máximos permitidos.



LIMON



LC-MS-MS V02p, 2013E

Parámetro	LOQ (mg/kg)	Parámetro	LOQ (mg/kg)
3-Hidroxycarbofuran	0.01	Uniconazol	0.01
Abamectina	0.01	Zoxamide	0.01
Acetamiprid	0.01		
Acetodol	0.01		
Aldicarb	0.01		
Aldicarb Sulfon	0.01		
Aldicarb sulfos	0.01		
Amifoz	0.01		
Azinfos-metil	0.01		
Benomilo	0.01		
Betavalcicarb-isopropil	0.01		
Bifenazato	0.005		
Boscalid	0.005		
Bromuconazol	0.01		
Buprofezin	0.01		
Carbent	0.01		
Carbendazim	0.01		
Cidoxim	0.01		
Cimoxanilo	0.01		
Clotodim	0.01		
Clotefezim	0.01		
Clorotraniliprol	0.005		
Clorpirifos	0.01		
Cotianidil	0.01		
Difentolurón	0.01		
Dimetomorf	0.01		
Dimetomorf	0.005		
Dodim	0.01		
Emanectina (Benzoato)	0.005		
Espirotriamato	0.005		
Fenprosimato	0.01		
Fenitro oxon-sulfona	0.01		
Fonicamid	0.01		
Fenclorfenuron	0.01		
Flubendazid	0.01		
Fenmetanato Hidro	0.01		
Fosmet	0.01		
Fostizate	0.01		
Hexoxip-p-metil	0.01		
Imazalil	0.01		
Imazalox	0.01		
Imazetapir	0.01		
Imidacprid	0.005		
Indoxacarb	0.01		
Iprovalcarb	0.01		
Isofenos metil	0.01		
Metaxos	0.01		
Metaxos	0.01		
Metopropamid	0.01		
Mepromil	0.01		
Metaridifos	0.01		
Methecarb sulfato	0.01		
Metolalil	0.01		
Metomilo	0.01		
Metoxifenocida	0.005		
Nitroprant	0.01		
Ometoato	0.01		
Pachicliracil	0.005		
Pencloron	0.01		
Pirimorfin	0.01		
Pracloprutena	0.005		
Prindanil	0.01		
Primetanil	0.01		
Prinicalb	0.01		
Prinicalb desmetil	0.01		
Prochloraz	0.01		
Prochloraz	0.01		
Propargil	0.01		
Propiconazole	0.01		
Rotenona	0.01		
Setoconil	0.01		
Spinetoram	0.01		
Spinosad	0.005		
Spinetorilifeno	0.01		
Tebuconazole	0.01		
Tepraloconil	0.01		
Thiabendazol	0.01		
Thiophanil	0.005		
Thiometoxan	0.01		
Thiodarb	0.01		
Thiometoxan metil	0.01		
Triamprolo	0.01		
Triflorine	0.01		
Trietanol metil	0.01		

Nota: Las unidades expresadas como LOQ(mg/kg)

# Limones Peruanos S.R.L.

Dom. Fiscal: 6 de agosto 748 oficina 308 Jesús María - Lima - Lima  
 Av. BRASÍ, NRO. 252 - BELLAVISTA - SULLANA - PIURA

CAL. CHALACALA 5N.CAS. CHALACALA - SULLANA - SULLANA - PIURA  
 RPM: 9954954348 - 4967695656  
 limones@limonesperuanos.com.pe

**RUC. 20600739345**  
**GUIA DE REMISION REMITENTE**  
**0004- N° 000876**

Fecha de Inicio del Traslado: 13 de octubre 2018 Punto de Partida: Fundo Limones Peruanos  
 Destinatario: Yeimy Janny Romero Castillo Km 18 Chalacala-Sullana-Piura.  
 R.U.C. \_\_\_\_\_ N° Doc. Ident: 47977703 Punto de Llegada: Trujillo

**MOTIVO DEL TRASLADO:**

- |  |  |   |
|--|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Venta sujeta a confirmación por el comprador | <input type="checkbox"/> Recibo de bienes          | <input type="checkbox"/> Traslado zona primaria                 |
| <input type="checkbox"/> Traslado entre establecimientos de la misma empresa     | <input type="checkbox"/> Importación               | <input type="checkbox"/> Traslado por emisor itinerante         |
| <input type="checkbox"/> Devolución  | <input type="checkbox"/> Exportación               | <input type="checkbox"/> Traslado de bienes para transformación |
| <input type="checkbox"/> Venta con entrega a terceros                            | <input type="checkbox"/> Otros (especificar) _____ |   |

**DATOS DEL BIEN TRANSPORTADO:**

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD MED.	PESO
Limón Sutil Fresco	7	bis	70 kg

DATOS DE LA UNIDAD DE TRANSPORTE Y CONECTOR

## ANEXO N°2

### TAXONOMÍA DE LA PLANTA *Citrus limón*



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO  
HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT)  
FLORA PERUANA



**Familia:** Rutaceae

**Nombre Científico:** *Citrus limon* (L.) Osbeck

**N. Vulgar:** "limonero", "limón".

**Det. Por:** Herbario HUT

**Hábito:** árbol de ca. 5 m de alto, flores blancas.

**Procedencia:** ciudad de Sullana, distrito Chalacala Alta

**Prov.:** Sullana

**Region/Dpto.:** Piura

**Hábitat:** terrenos arenosos-arcillosos

**Altitud:** 65 m.s.n.m.

**Fecha:** 21/08/2020

**Colector:** Romero Castillo, Yeimy Janny

**N°:** s.n.

Tesis de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología,  
Universidad Católica los Angeles de Chimbote - Sede Trujillo

Tesis: "EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus Limon*  
(LIMON) Al 75% y 100% SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 Y  
*Streptococcus sanguis* ATCC 10556 TRUJILLO, 2018".

ANEXO N°3

FACTURAS DE LAS BACTERIAS STREPTOCOCCUS MUTANS Y STREPTOCOCCUS SANGUIS



Page 1 of 1

**Gen Lab del Perú S.A.C**  
 Jr. Capac Yupanqui N°. 2434  
 Lince - Lima - Perú  
 Central Telefónica  
 (51-1) 203-7500, (51-1) 203-7501  
 Email : ventas@genlabperu.com  
 Web Site : www.genlabperu.com

**RUC N°:20501262260**  
**FACTURA**  
**ELECTRONICA**  
**F001-001689**

Fecha emisión : 12/10/2018	Orden Compra: COTIZ-18-031479
Fecha Vcto : 12/10/2018	Guía de Remisión :
Cliente: UNIVERSIDAD CATOLICA LOS ANGELES DE CHIMBOTE	N° Pedido : 020718
Dirección: JR. TUMBES NRO. 247 CENTRO COMERCIAL Y FINANCIERO CHIMBOTE - SANTA - ANCASH - Peru	
RUC : 20319956043	Tipo Movimiento : ANTICIPOS
Lugar de destino :	

Código	Descripción	Cant	U/M	Precio Unit.	Dscto	Sub-Total
H0566-A	KWK-STIK Streptococcus mutans derived from ATCC® 25175™	1	UND	309.74	0.00	309.74

TRESCIENTOS SESENTA Y CINCO CON 49/100 SOLES



Anticipo	0.00
Op. Gravada S/	309.74
IGV 18%	55.75
Importe Total S/	365.49

Representación Impresa de la Factura Electrónica  
 Consulte : <http://cpe.genlabperu.com>

**Observaciones de SUNAT :**  
 La Factura numero F001-001689, ha sido aceptada

Después de Vencido el plazo de cancelación, se recargará el interés legal correspondiente.  
**Sírvanse Realizar el Depósito Respectivo a las Sigüientes Ctas Bancarias:**  
 BCP Soles 193-1440607-0-84      BBVA Soles 0011-0139-0100024183-34



Gen Lab del Perú S.A.C  
Jr. Capac Yupanqui N°. 2434  
Lince - Lima - Perú  
Central Telefónica  
(51-1) 203-7500, (51-1) 203-7501  
Email : ventas@genlabperu.com  
Web Site : www.genlabperu.com

RUC N°:20501262260  
**FACTURA  
ELECTRONICA  
F001-001688**

Page 1 of 1

Fecha emisión : 12/10/2018	Orden Compra: COTIZ- 18-031227
Fecha Vcto : 12/10/2018	Guía de Remisión :
Cliente: UNIVERSIDAD CATOLICA LOS ANGELES DE CHIMBOTE	N° Pedido : 020717
Dirección: JR. TUMBES NRO. 247 CENTRO COMERCIAL Y FINANCI CHIMBOTE - SANTA - ANCASH - Peru	Tipo Movimiento : ANTICIPOS
RUC : 20319956043	
Lugar de destino :	

Código	Descripción	Cant	U/M	Precio Unit.	Dcto	Sub-Total
H05687-A	KWIK-STIK Streptococcus sanguinis derived from ATCC® 10556™	1	UND	309.75	0.00	309.75

TRESCIENTOS SESENTA Y CINCO CON 51/100 SOLES



Anticipo		0.00
Op. Gravada S/		309.75
IGV 18%		55.76
Importe Total S/		365.51

Representacion Impresa de la Factura Electrónica  
Consulte : <http://lcp.e.genlabperu.com>

**Observaciones de SUNAT :**

La Factura numero F001-001688, ha sido aceptada

Despues de Vencido el plazo de cancelacion, se recargará el interes legal correspondiente.

**Sirvanse Realizar el Deposito Respectivo a las Siguyentes Ctas Bancarias:**

**BCP Soles 193-1440607-0-84**

**BBVA Soles 0011-0139-0100024183-34**

## ANEXO N°4

### CONSTANCIA

Yo, Manuela Natividad Luján Velásquez, Biólogo – Microbiólogo docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, con registro del CBP N° 2132.

Mediante la presente dejo constancia de haber colaborado con la alumna ROMERO CASTILLO YEIMY JANNY, estudiante de la Facultad de Odontología de la Universidad Los Ángeles de Chimbote con DNI 47971103, en la ejecución de la parte microbiológica planteada en el proyecto de investigación titulado: **-Efecto antibacteriano del aceite esencial de “*Citrus limon (Limón)* al 75% y 100% sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus Sanguis* (ATCC 10556)”**.



Manuela Natividad Luján Velásquez

Docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología

Universidad Nacional de Trujillo.

-----  
Dra. Manuela Natividad Luján Velásquez  
CATEDRA DE INMUNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

## ANEXO N° 5



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Trujillo 29 de noviembre del 2018

### CONSTANCIA DE COLABORACION

Yo, **MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ**, docente de la Cátedra de Farmacognosia del Departamento Académico de Farmacotecnia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, con código UNT 5727 y acreditada como Docente Investigadora por CONCYTEC con número de registro REGINA: N° 1582.

Dejo constatar mi colaboración con la alumna **Romero Castillo Yeimy Janny** en las actividades de acondicionamiento de la muestra vegetal, preparación del aceite de limón y sus concentraciones de ensayo, en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de La Universidad Nacional de Trujillo. Asimismo, las concentraciones de ensayo preparadas serán utilizadas para el desarrollo de la tesis titulada: "Efecto antibacteriano del aceite esencial Citrus Limón (limón) al 75% y 100% sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556).

Atentamente,



  
Dra. MARILU ROXANA SOTO VÁSQUEZ  
Docente Investigadora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Laboratorio de Farmacognosia  
Universidad Nacional de Trujillo

**ANEXO N°6**

**FICHA DE RECOLECCION DE DATOS**

Aceite Concentración	ACEITE ESENCIAL DE <i>Citrus limon (Limón)</i> (mm)		C+	C-
	75%	100%	(mm)	(mm)
Repeticiones				
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				

## ANEXO N° 7

### RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Tamaño promedio de los halos de inhibición (en mm) según grupo de tratamiento con la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Trujillo, 2018

Aceite Concentración	ACEITE ESENCIAL DE <i>Citrus (Limón)</i> (mm)		C+	C-
	75%	100%	(mm)	(mm)
Repeticiones				
11.	17	26	24	0
12.	18	28	25	0
13.	17	29	24	0
14.	17	26	24	0
15.	18	28	25	0
16.	18	28	24	0
17.	17	30	26	0
18.	17	30	24	0
19.	17	30	24	0
20.	18	28	25	0

C+= Gluconato de clorhexidina al 0.12%

C- = SSFE/Tween 80

Tamaño promedio de los halos de inhibición (en mm) según grupo de tratamiento con la cepa *Streptococcus sanguis* ATCC 10556. Trujillo, 2018

extractos Concentración	ACEITE ESENCIAL DE <i>Citrus (Limón)</i> (mm)		C+	C-
	75%	100%	(mm)	(mm)
21.	20	30	15	0
22.	24	30	15	0
23.	20	28	15	0
24.	19	28	15	0
25.	20	30	16	0
26.	20	32	16	0
27.	18	30	15	0
28.	19	33	15	0
29.	20	34	16	0
30.	20	33	16	0

C+= Gluconato de clorhexidina al 0.12%

C- = SSFE/Tween 80

**ANEXO N° 8**

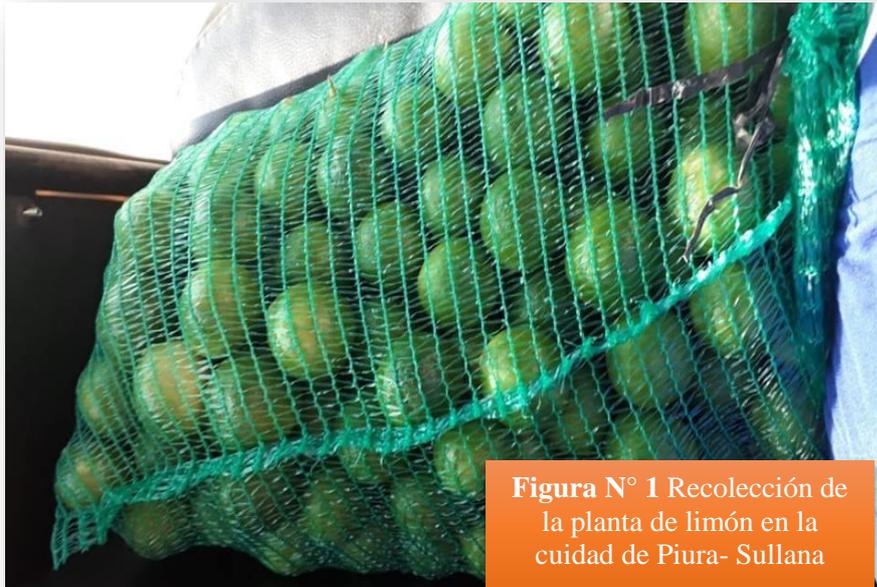
**Cuadro N° 4**

Ensayo	Aceite esencial de <i>Citrus limón</i> (limón) al 75% (mm)		Aceite esencial de <i>Citrus limón</i> (limón) al 100% (mm)		Clorhexidina al 0.12% (mm)		SSEF/Tween 80 (mm)	
	<i>S.mutans</i>	<i>S.sanguis</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.sanguis</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.sanguis</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.sanguis</i>
1	17	20	26	30	24	15	0	0
2	18	24	28	30	25	15	0	0
3	17	20	29	28	24	15	0	0
4	17	19	26	28	24	16	0	0
5	18	20	28	30	25	16	0	0
6	18	20	28	32	24	15	0	0
7	17	18	30	30	26	15	0	0
8	17	19	30	33	24	16	0	0
9	17	20	30	34	24	16	0	0
10	18	20	28	33	25		0	0
Promedio	17.4	20	28.3	30.8	24.5	15.4	0	0
Prueba de normalidad de KOLGOMOROV SMIRNOV	P= 0.0583 Normal	P= 0.1005 Normal	P= 0.0803 Normal	P= 0.2291 Normal	P= 0.4877 Normal	P= 0.5123 Normal		

## ANEXO N° 9

### FOTOS DEL PROTOCOLO EXPERIMENTAL

#### Obtención del aceite esencial



**Figura N° 1** Recolección de la planta de limón en la ciudad de Piura- Sullana



**Figura N° 2** Se lavó con agua potable los frutos



**Figura N° 3** Se colocó agua potable en un frasco



**Figura N° 4** Se colocó dentro del frasco unas 3 gotitas de hipoclorito de sodio



**Figura N° 5** Colocar dentro del frasco con agua potable hipoclorito de sodio



**Figura N° 6** Se colocó dentro del frasco los frutos para desinfectar con hipoclorito de sodio al 0.5%



**Figura N° 7** Luego de lavar y desinfectar se colocó el fruto sobre papel kraft



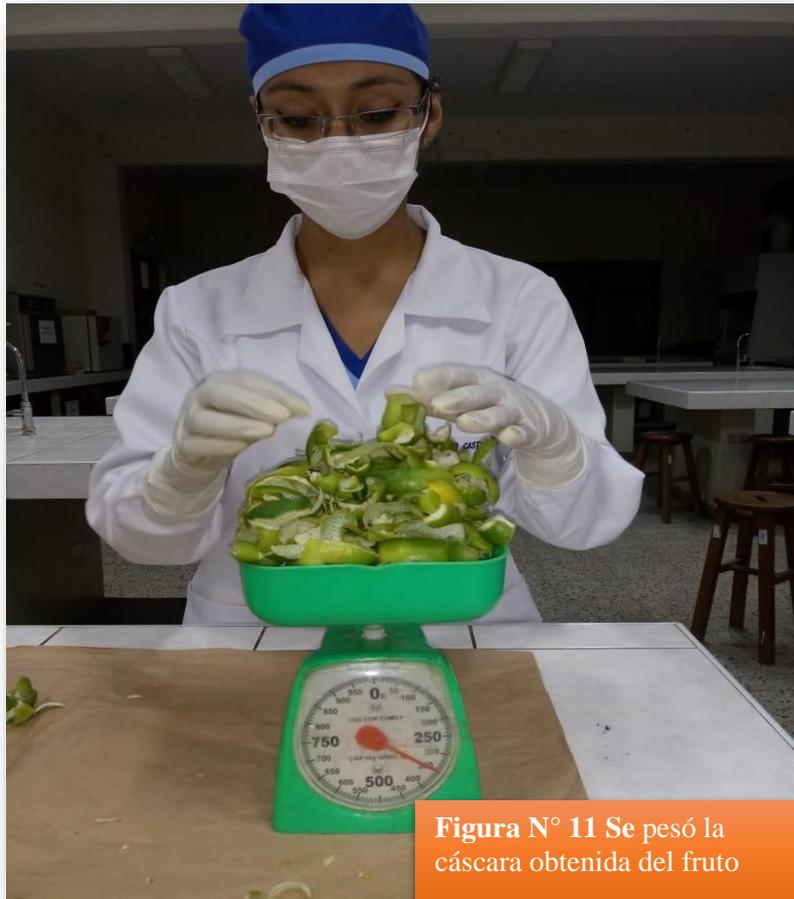
**Figura N° 8** Luego de lavar y desinfectar se colocó el fruto sobre papel Kraft



Figura N° 9 Se peló el fruto



Figura N° 10 Obtención de la cáscara del fruto



**Figura N° 11** Se pesó la cáscara obtenida del fruto



**Figura N° 12** Se armó el equipo de destilación y se sometió la muestra a la corriente de vapor de agua sobrecalentada



**Figura N° 13** Para la separación del agua y el aceite esencial se utilizó una pera de separación de vidrio.



**Figura N° 14** Observamos el aceite esencial filtrado

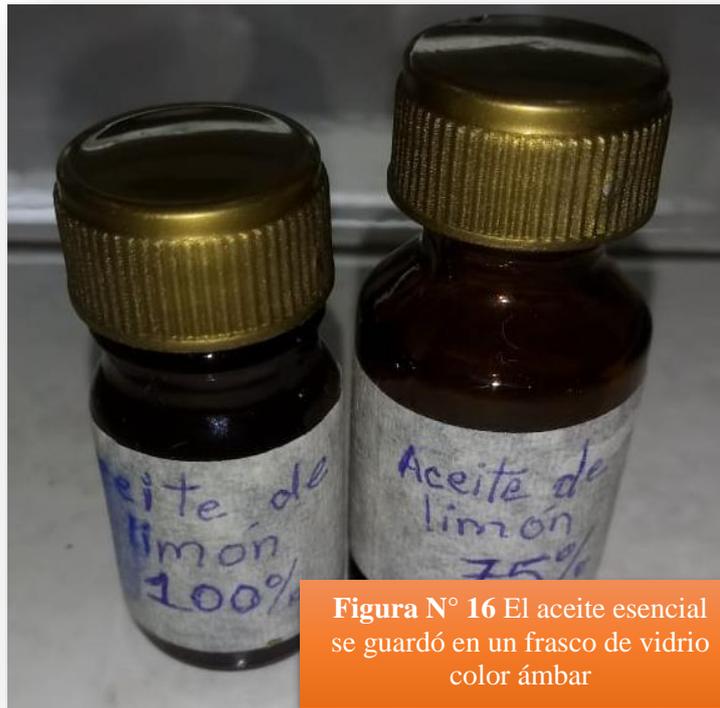


Figura N° 16 El aceite esencial se guardó en un frasco de vidrio color ámbar

## PROCEDIMIENTO MICROBIOLÓGICO



Figura N° 17 La cepa de *streptococcus mutans* y *streptococcus sanguis* se diluyó en solución salina estéril



**Figura N° 18** La solución salina estéril se colocó dentro de la cepa de *Streptococcus mutans* de igual manera con la bacteria *Streptococcus sanguis*



**Figura N° 19** Se agitó hasta obtener una turbidez

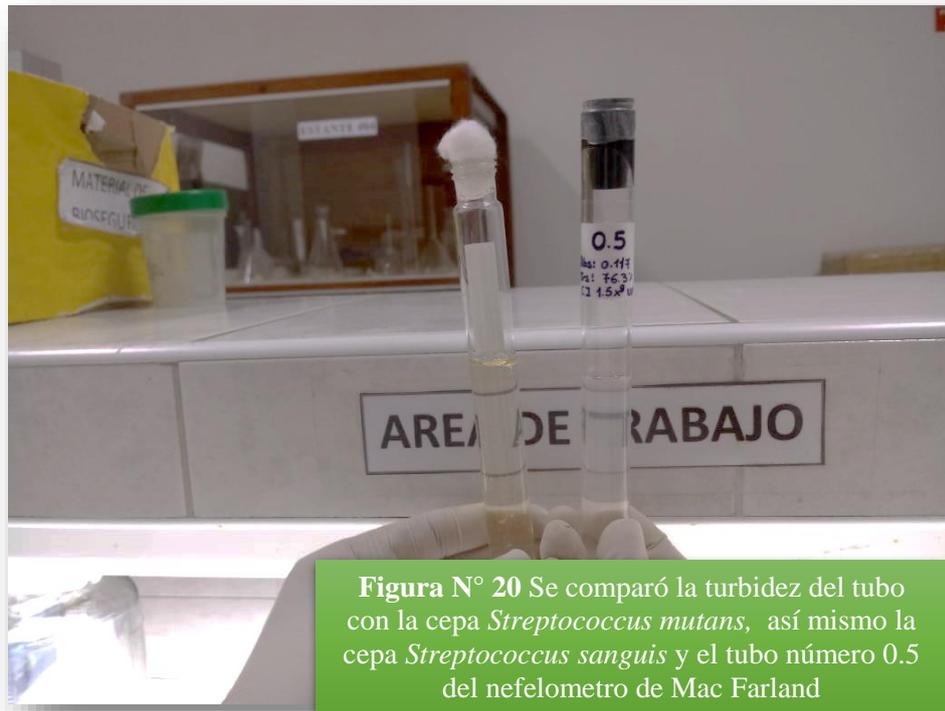
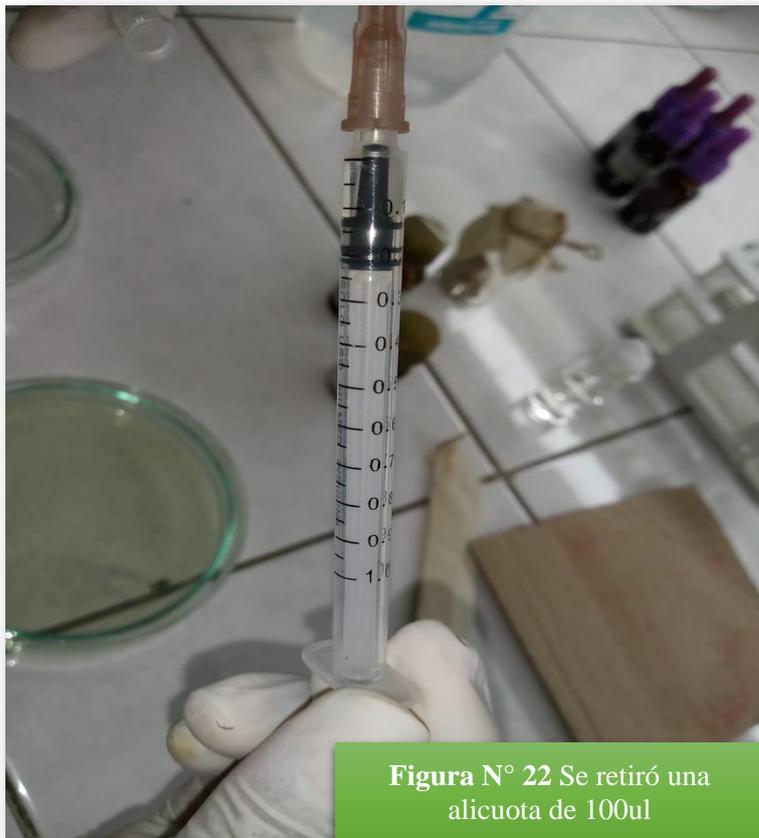


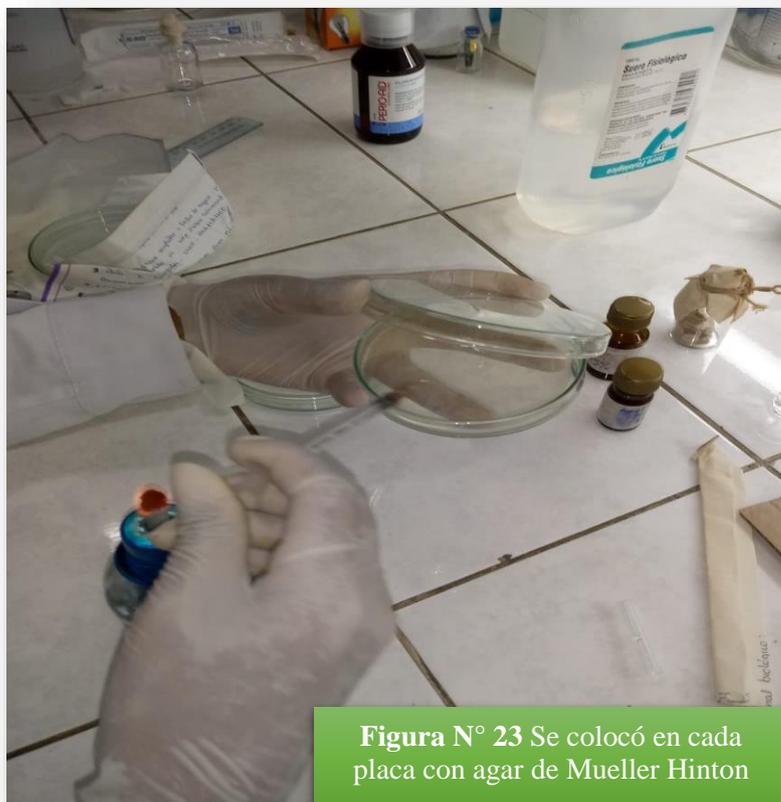
Figura N° 20 Se comparó la turbidez del tubo con la cepa *Streptococcus mutans*, así mismo la cepa *Streptococcus sanguis* y el tubo número 0.5 del nefelometro de Mac Farland



Figura N° 21 Se retiró una alicuota de 100ul



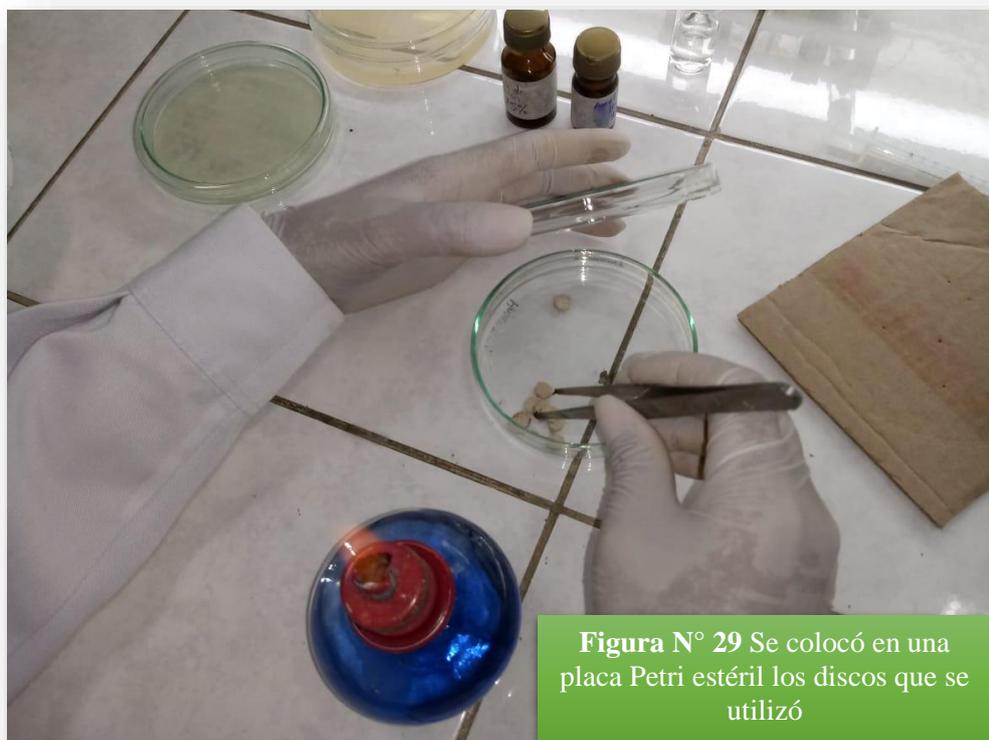
**Figura N° 22** Se retiró una alicuota de 100ul

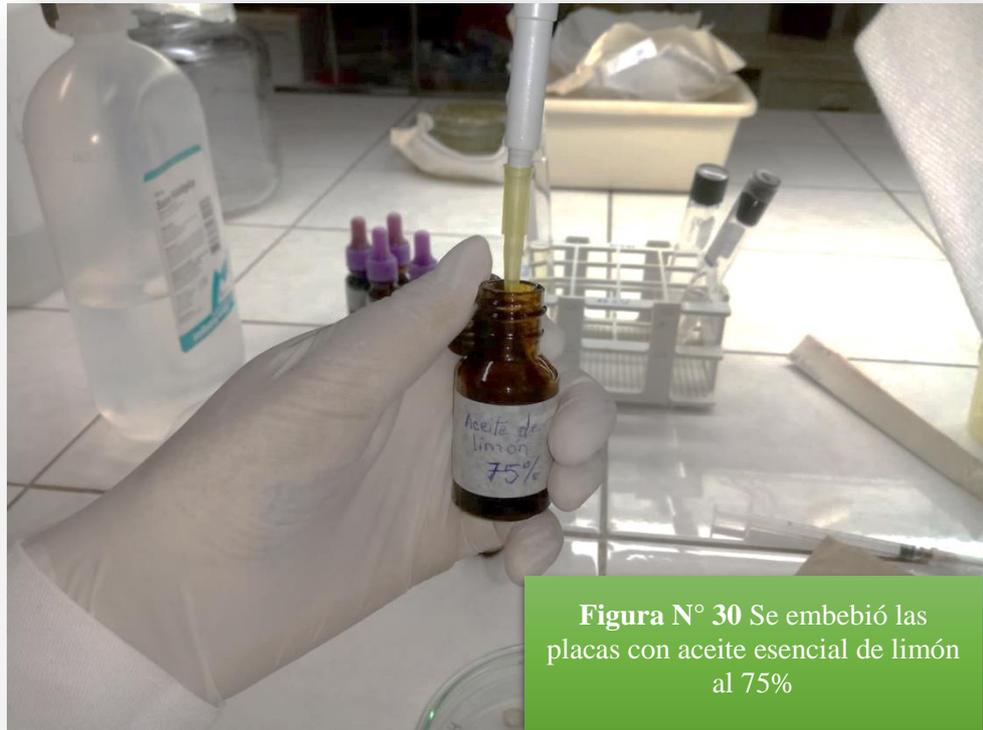


**Figura N° 23** Se colocó en cada placa con agar de Mueller Hinton





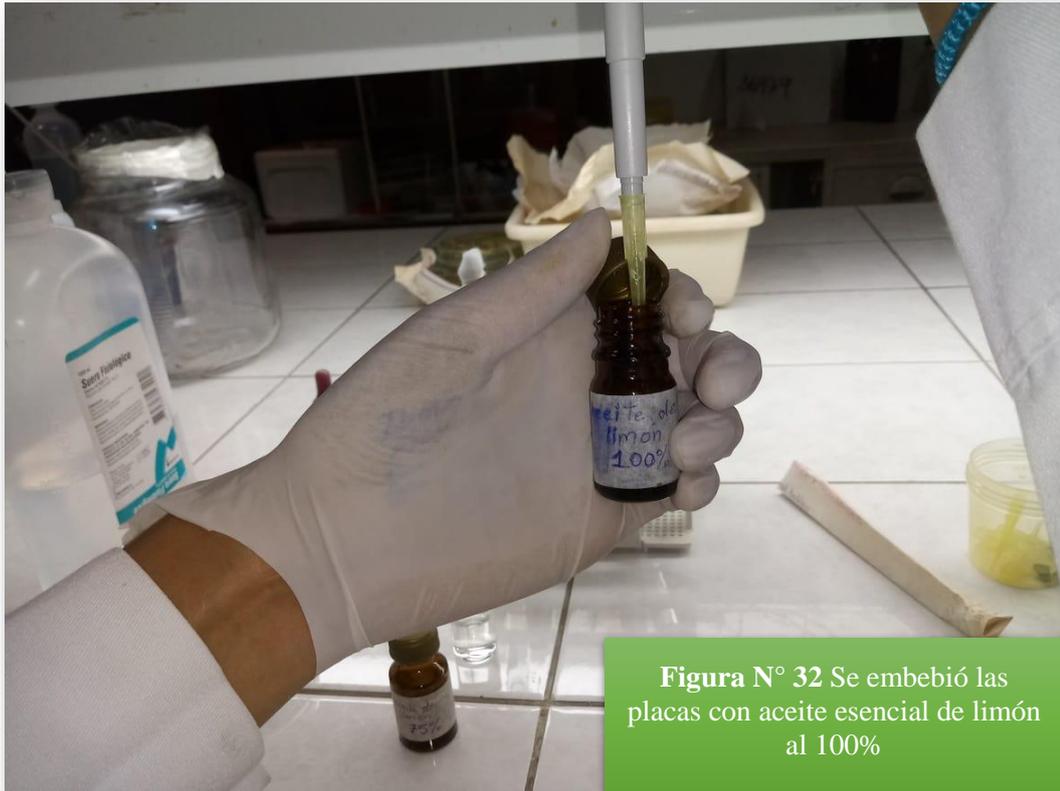




**Figura N° 30** Se embebió las placas con aceite esencial de limón al 75%



**Figura N° 31** Se colocó en cada disco el aceite esencial al 75%



**Figura N° 32** Se embebió las placas con aceite esencial de limón al 100%



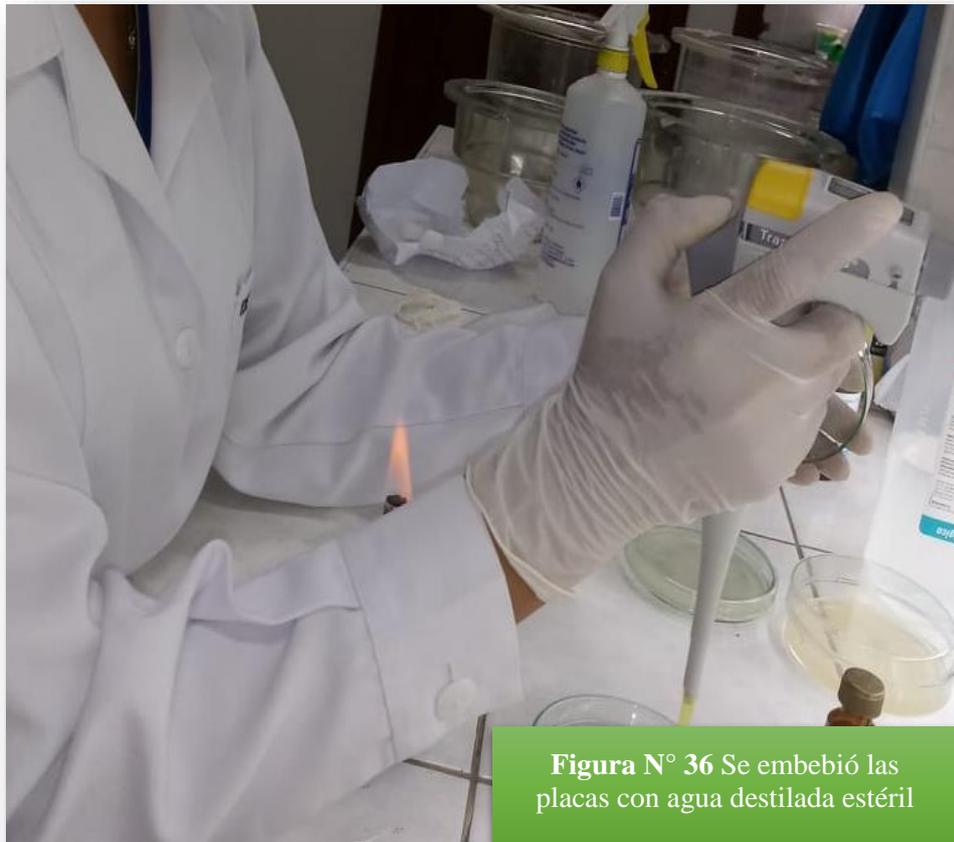
**Figura N° 33** Se colocó en cada disco el aceite esencial al 100%



**Figura N° 34** Se embebió las placas con clorhexidina al 0.12%



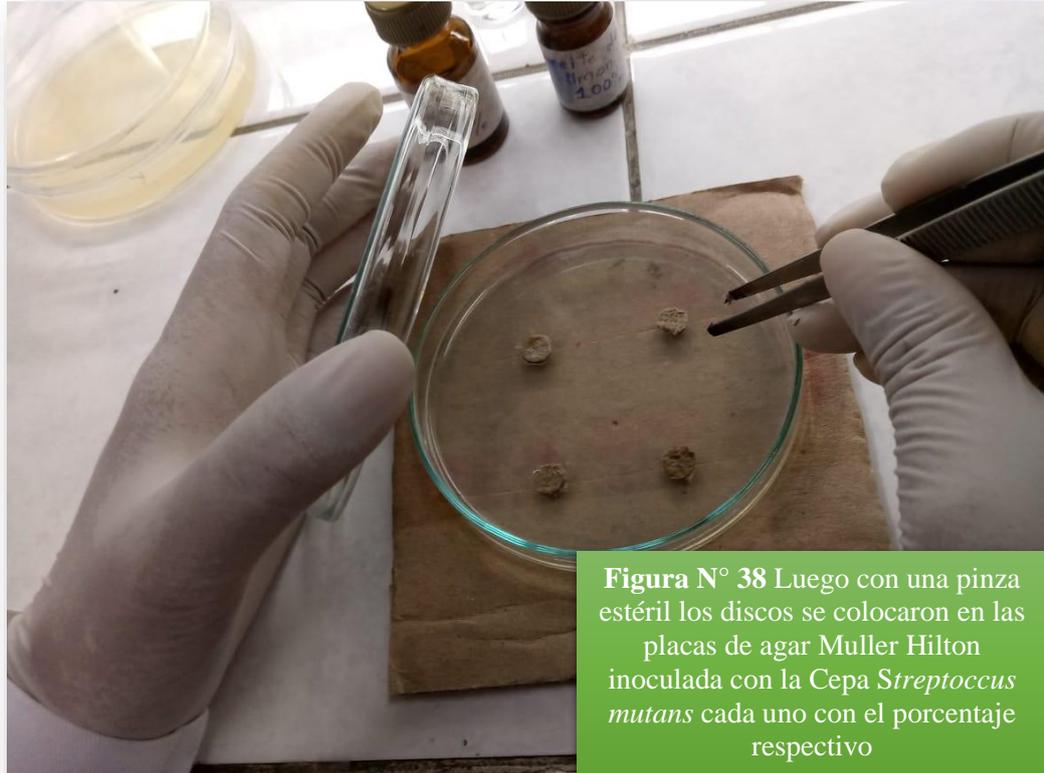
**Figura N° 35** Se colocó en cada disco la clorhexidina al 0.12%



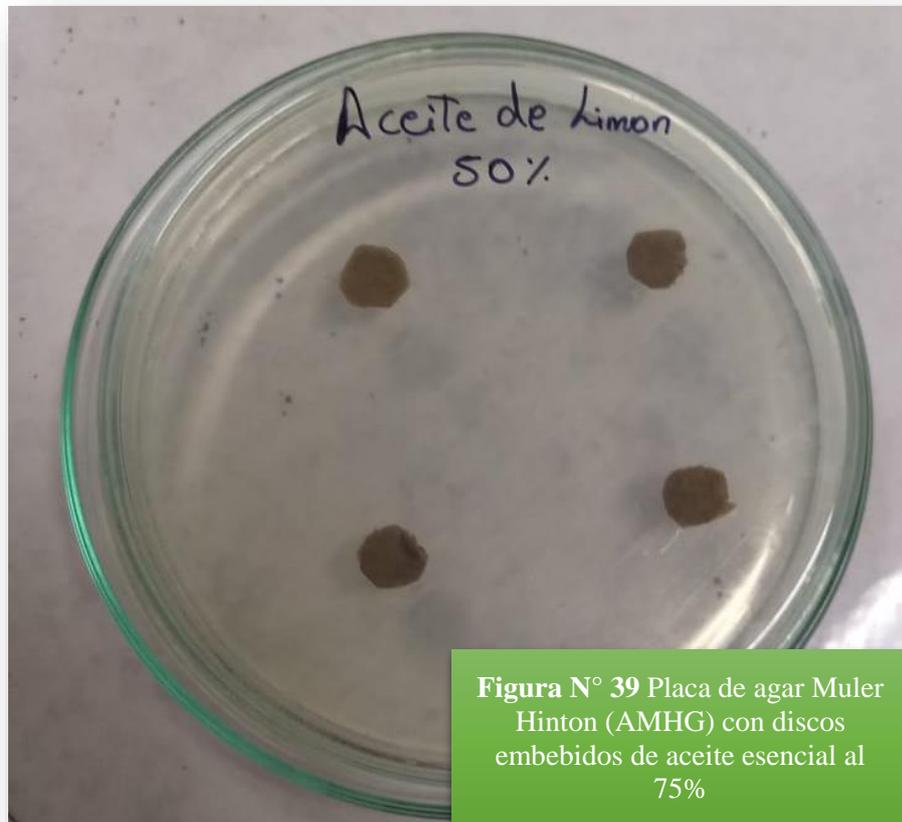
**Figura N° 36** Se embebió las placas con agua destilada estéril



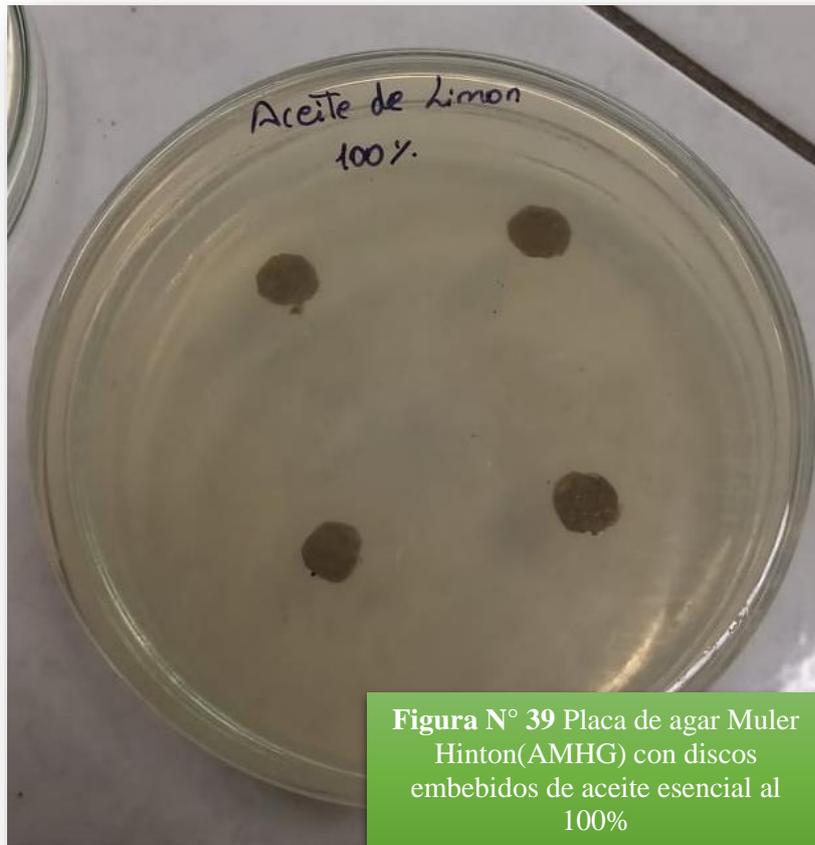
**Figura N° 37** Se colocó en cada disco con agua destilada estéril



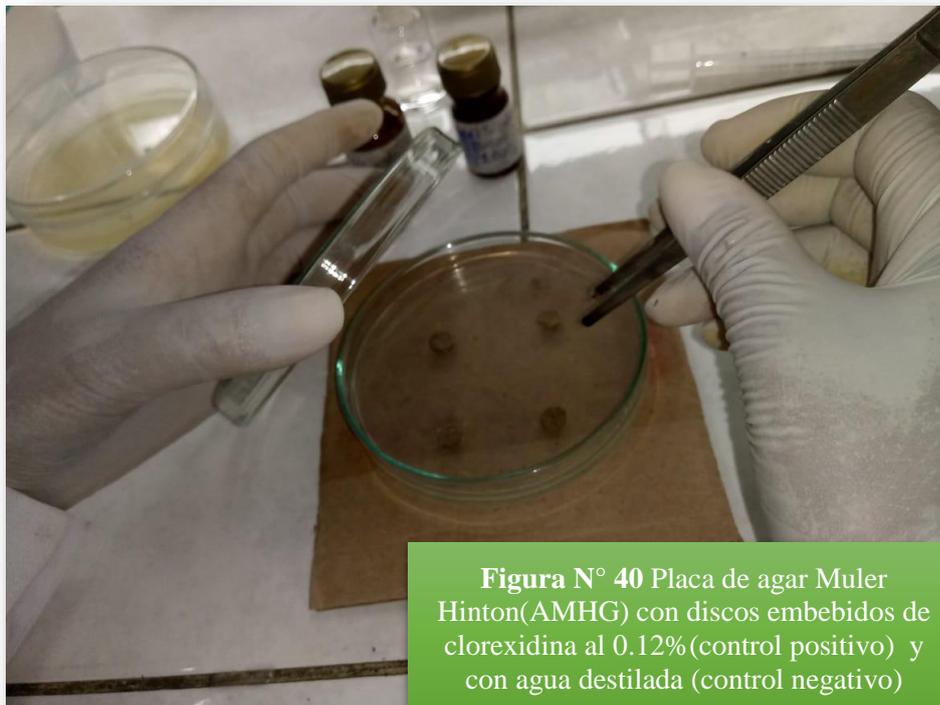
**Figura N° 38** Luego con una pinza estéril los discos se colocaron en las placas de agar Muller Hilton inoculada con la Cepa *Streptococcus mutans* cada uno con el porcentaje respectivo



**Figura N° 39** Placa de agar Muler Hinton (AMHG) con discos embebidos de aceite esencial al 75%



**Figura N° 39** Placa de agar Muller Hinton (AMHG) con discos embebidos de aceite esencial al 100%



**Figura N° 40** Placa de agar Muller Hinton (AMHG) con discos embebidos de cloxidina al 0.12% (control positivo) y con agua destilada (control negativo)



## RESULTADOS DE LA PRUEBA

### *Streptococcus mutans*

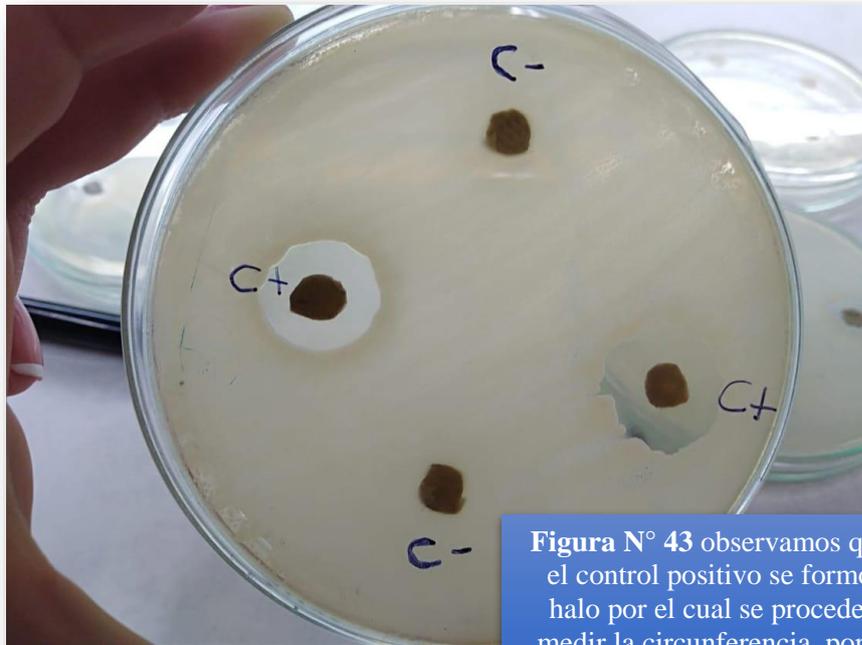


Figura N° 43 observamos que en el control positivo se formó un halo por el cual se procederá a medir la circunferencia, por otro lado no se formó ningún halo en el control negativo

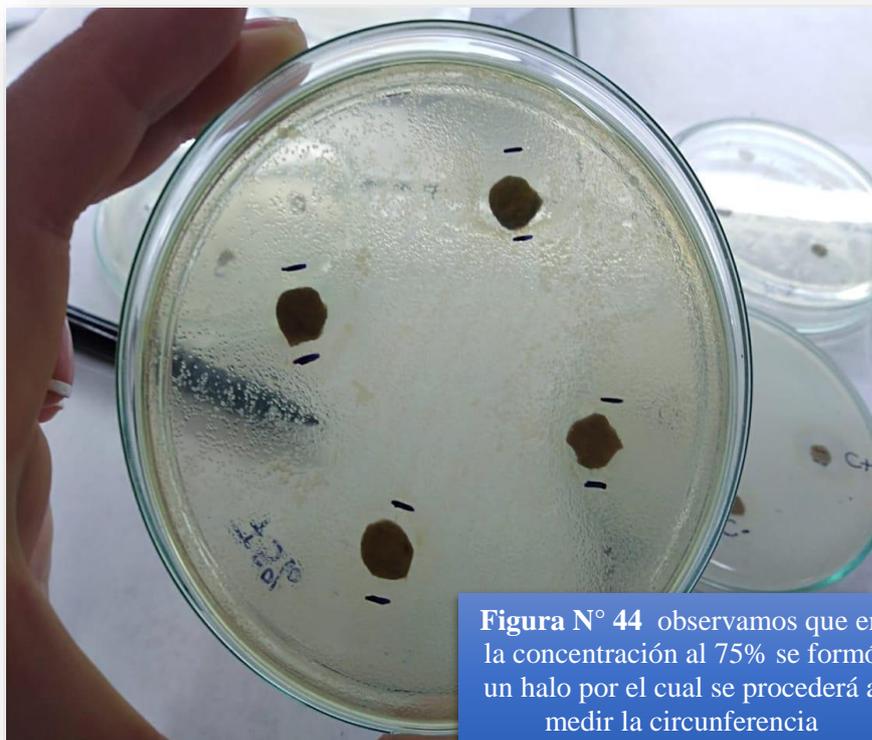


Figura N° 44 observamos que en la concentración al 75% se formó un halo por el cual se procederá a medir la circunferencia

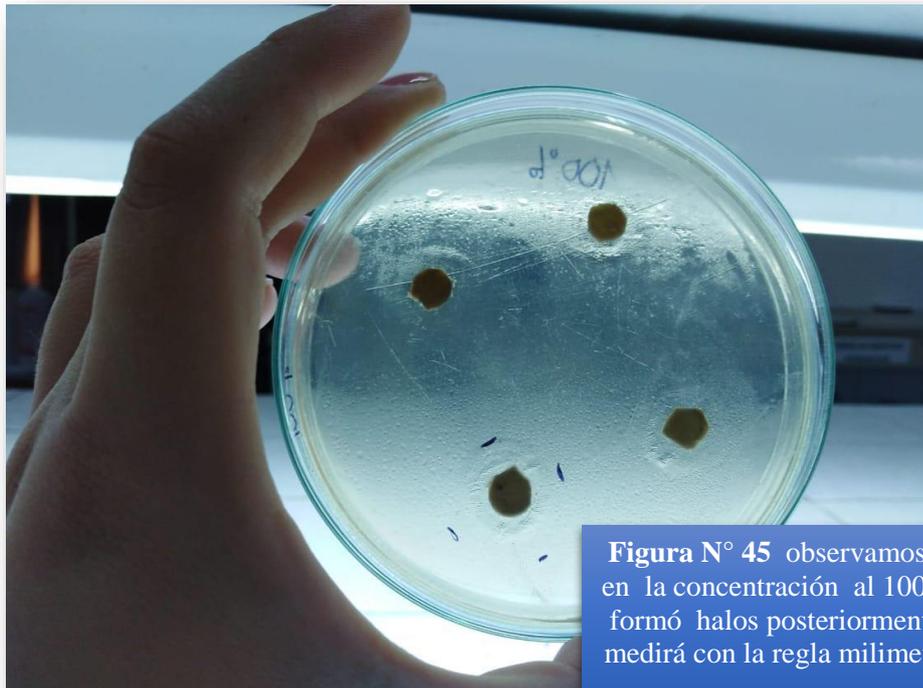


Figura N° 45 observamos que en la concentración al 100% se formó halos posteriormente se medirá con la regla milimetrada

***Streptococcus sanguis***

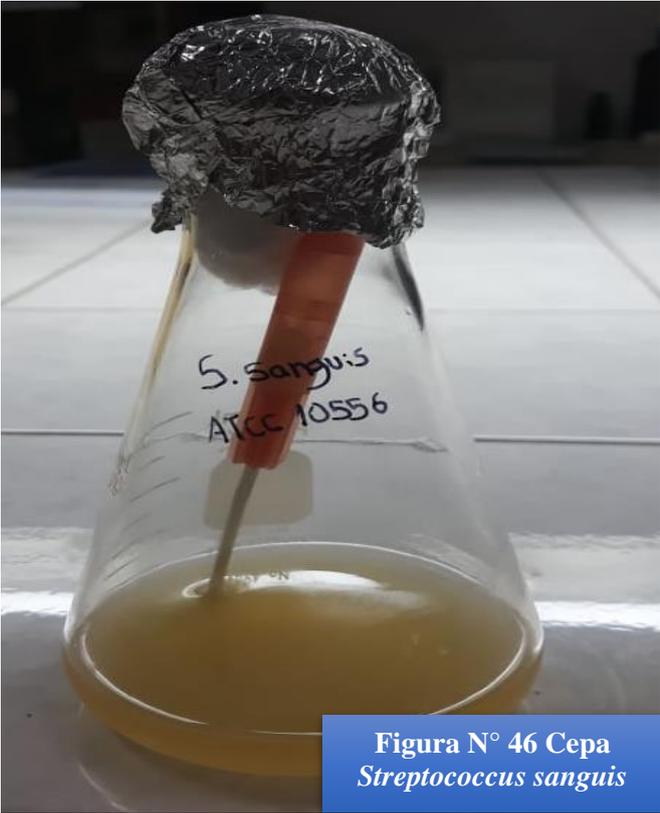
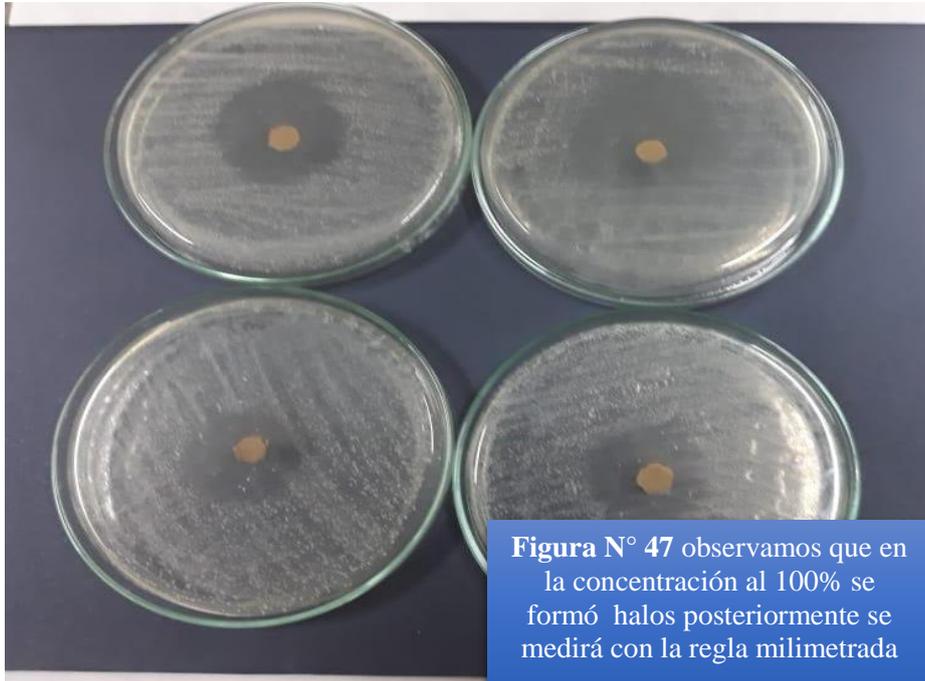
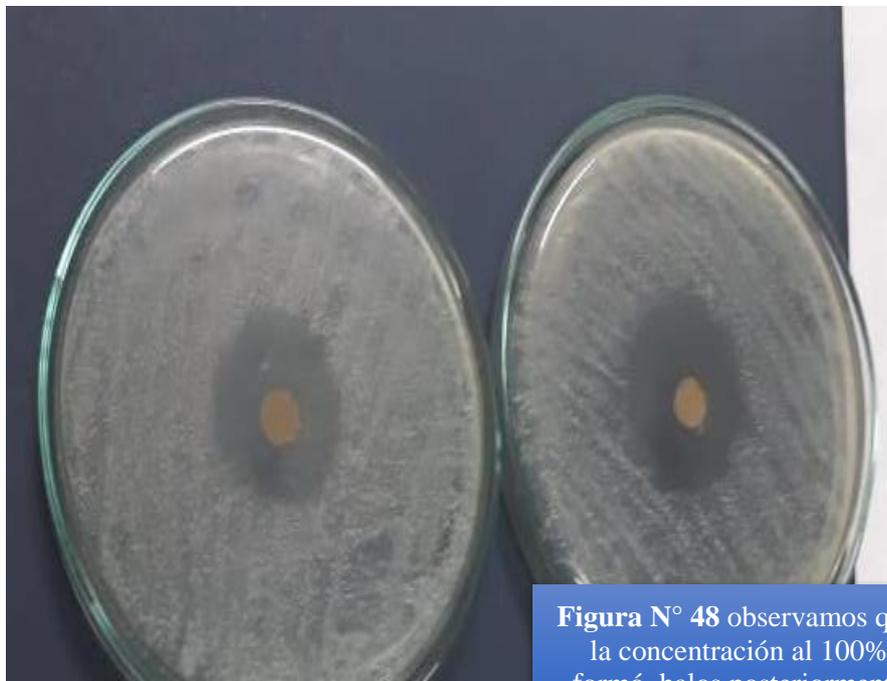


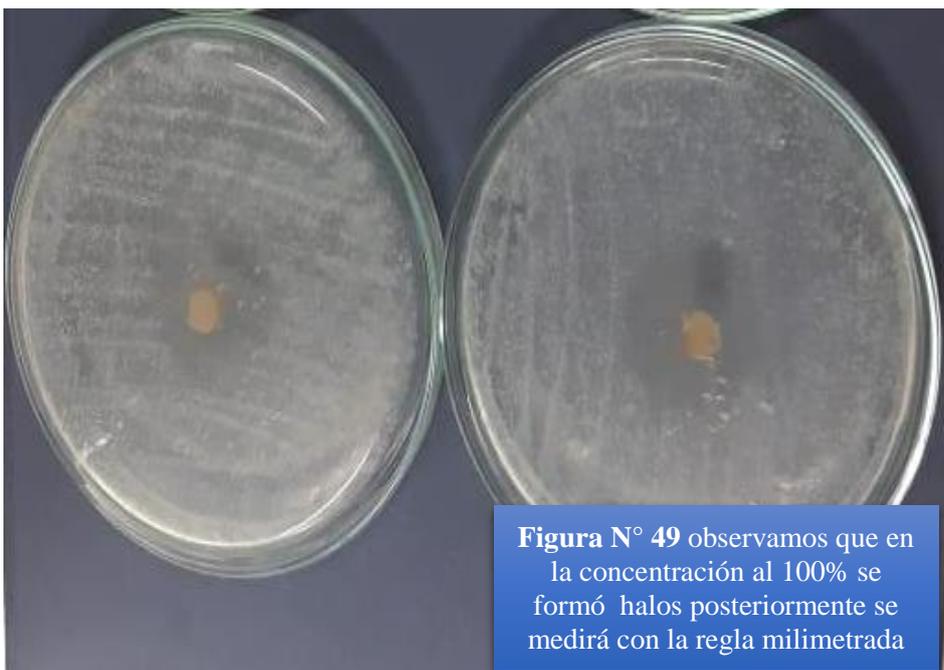
Figura N° 46 Ceba *Streptococcus sanguis*



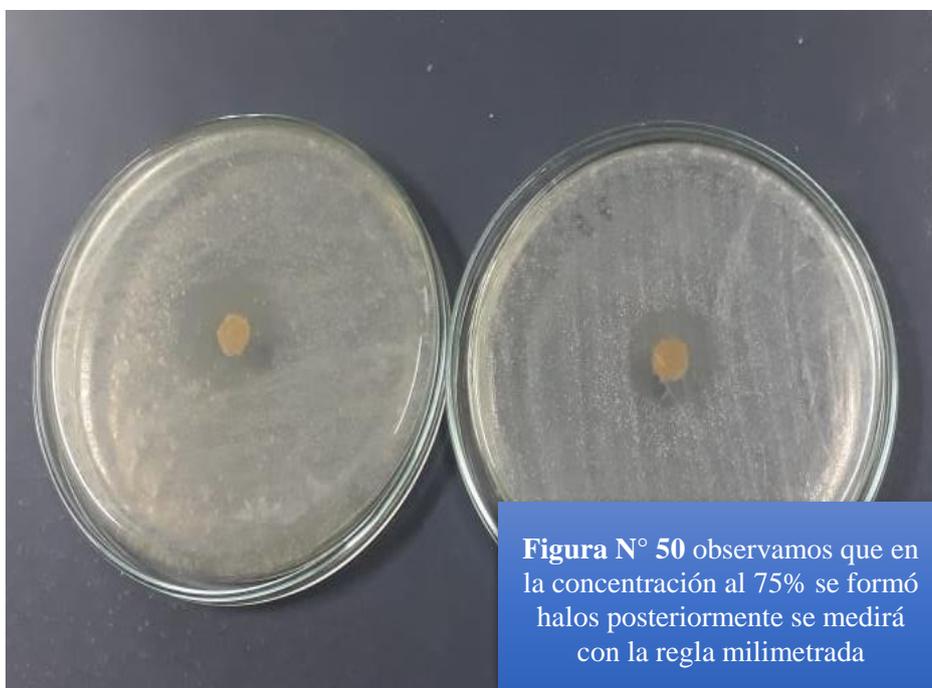
**Figura N° 47** observamos que en la concentración al 100% se formó halos posteriormente se medirá con la regla milimetrada



**Figura N° 48** observamos que en la concentración al 100% se formó halos posteriormente se medirá con la regla milimetrada



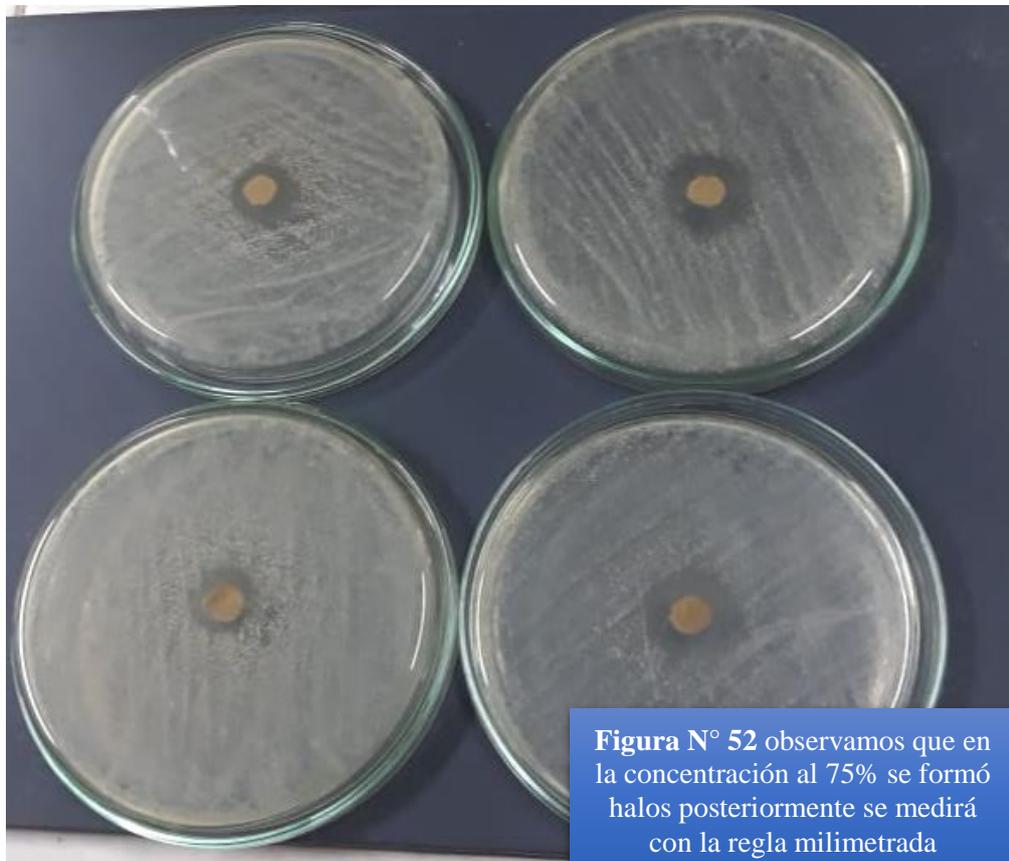
**Figura N° 49** observamos que en la concentración al 100% se formó halos posteriormente se medirá con la regla milimetrada



**Figura N° 50** observamos que en la concentración al 75% se formó halos posteriormente se medirá con la regla milimetrada



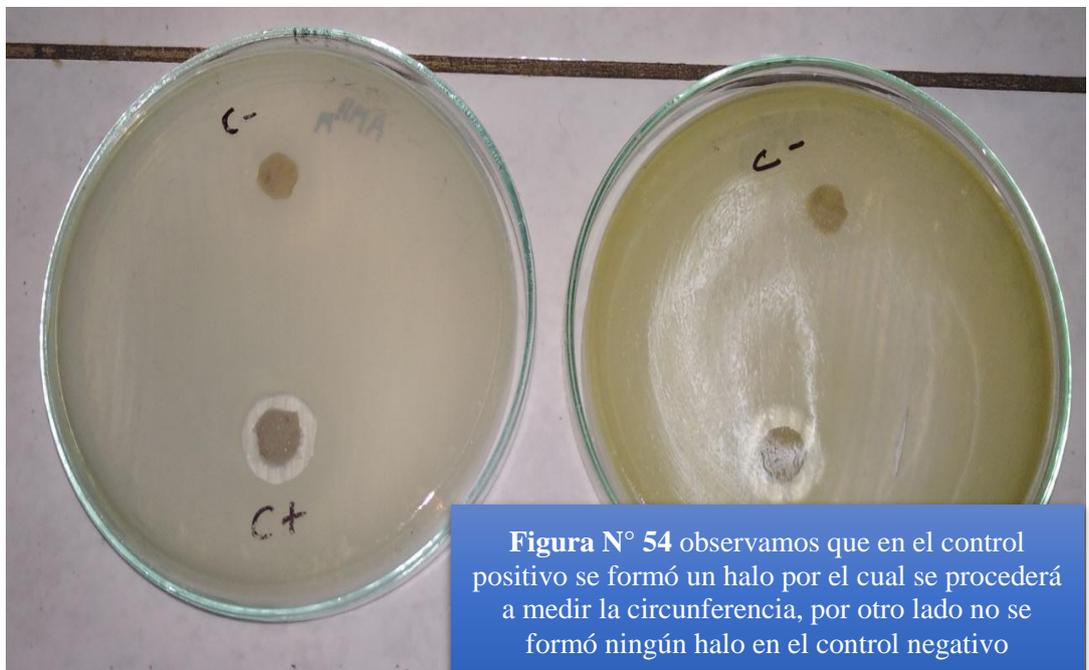
**Figura N° 51** observamos que en la concentración al 75% se formó halos posteriormente se medirá con la regla milimetrada



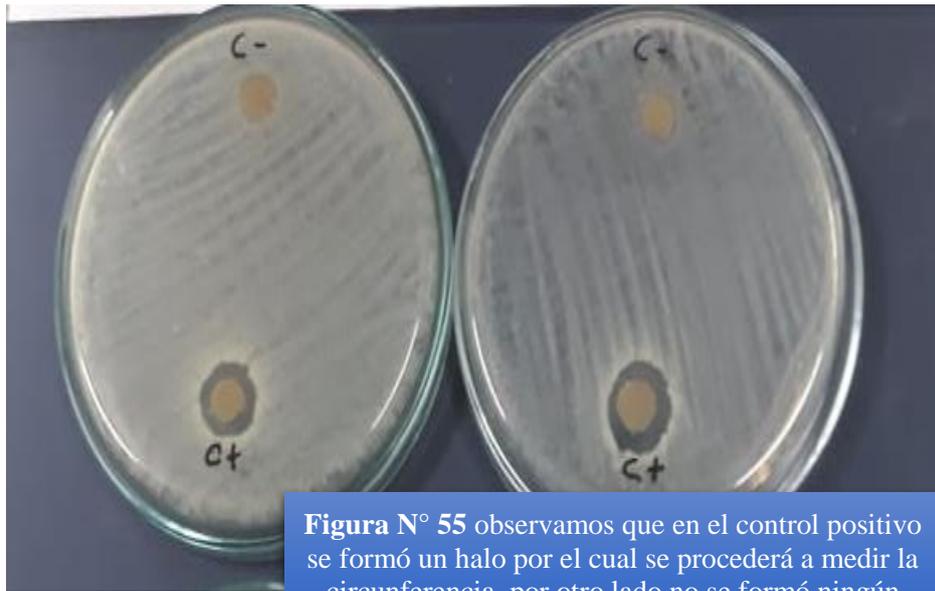
**Figura N° 52** observamos que en la concentración al 75% se formó halos posteriormente se medirá con la regla milimetrada



**Figura N° 53** observamos que en la concentración al 75% se formó halos que luego se medirá con la regla milimetrada



**Figura N° 54** observamos que en el control positivo se formó un halo por el cual se procederá a medir la circunferencia, por otro lado no se formó ningún halo en el control negativo



**Figura N° 55** observamos que en el control positivo se formó un halo por el cual se procederá a medir la circunferencia, por otro lado no se formó ningún halo en el control negativo

## ANEXO N° 10

### DOCUMENTO DE DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERES

Declaro no tener conflictos de intereses financieros, ni personales que puedan influir inapropiadamente en el desarrollo de esta investigación.

Declaro no tener conflicto de intereses institucionales, dada la representación de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote sede Trujillo, a través de sus miembros.



---

Romero Castillo, Yeimy Janny