

**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>**

DA SILVA, ANA PAULA<sup>2</sup>



Ana Paula da Silva

**RESUMEN**

Para el trabajo titulado “Determinación de la actividad antibacteriana de tres variedades de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck, *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación con *Citrus reticulata* y *Citrus medica* L.) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*” se obtuvieron el aceite esencial y macerado de la hoja, cáscara y semilla de limón. Los resultados obtenidos demuestran que frente a *Staphylococcus aureus* el aceite esencial y el macerado obtenido de hoja y cáscara de las tres variedades presenta actividad antibacteriana y no de la semilla. Frente a *Escherichia coli* el aceite esencial obtenido de la hoja de las tres variedades presenta actividad antibacteriana, y no de la semilla. La variedad *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación *Citrus reticulata* y *Citrus medica* (L) presenta actividad de la cáscara. El macerado frente a *Escherichia coli* no presenta actividad antibacteriana.

**ABSTRACT**

For work entitled “Determination of the antibacterial activity of three varieties of lemon (*Citrus limon* (L) Osbeck, *Citrus limon* (L) Osbeck in combination with *Citrus reticulated* and *Citrus medical* L.) against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*” the essential and macerated leaf, seed and lemon peel oil were obtained. The results show that against *Staphylococcus aureus* the essential oil and the macerated obtained from the leaves and peel of the three varieties present antibacterial activity and not from the seed. Against *Escherichia coli* essential oil obtained from the three varieties it presents antibacterial activity, and not from the seed. The variety *Citrus lemon* (L) Osbeck combined with *Citrus reticulated* and *Citrus medical* (L) presents activity from the peel. The macerated against *Escherichia coli* does not present antibacterial activity.

**PALABRAS CLAVE:** Limón; Variedades de limón; Actividad antibacteriana; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia Coli*

**KEYWORDS:** Lemon; Lemon varieties; Antibacterial activity; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia Coli*

**INTRODUCCIÓN**

La tendencia hacia la medicina natural ha obtenido un ímpetu gracias a la preocupación por las cuestiones medioambientales, la destrucción de los bosques tropicales y la extinción de especies.

Las plantas con mayor estudio son las del género *Citrus*, principalmente los extractos de limón (*Citrus limón*), que poseen una gran actividad antibacteriana de amplio espectro no tóxico, gracias a hesperidina y naringina, el cual es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias grampositivas y gramnegativas sin producir efectos secundarios.

Se ha indicado el valor medicinal del limón que alivia el dolor estomacal, y que actúa contra amigdalitis, acidez, náuseas, inflamación articular. Además el aceite esencial extraído de la cáscara, membrana blanca, pulpa y semilla presenta la actividad antibacteriana sobre bacterias grampositivas y gramnegativas.

Las plantas pueden producir aceite esencial para diversos fines; la protegen de plagas, enfermedades e inclusive de la invasión de otras plantas; para atraer insectos y aves (polinizantes). Estas cualidades de protección y atracción, se ven reflejadas en propiedades: antisépticas, antiinflamatorias, antibacterianas, antidepressivas, afrodisiacas y otras, presentes en mayor o menor grado en la totalidad de los aceites.

Los aceites esenciales son productos obtenidos del reino vegetal, están formados por mezclas complejas de hidrocarburos, compuestos oxigenados y residuos no volátiles. Éstos están contenidos en glándulas o vesículas secretoras inmersas en los tejidos de las hojas, flores,

corteza (pericarpio) y semillas de los frutos de muchas especies.

En los últimos años se han realizado muchas investigaciones que han demostrado el poder antibacteriano de los aceites esenciales, especialmente los extraídos de frutas cítricas; en estos estudios se demostraron que los aceites esenciales de limón tienen actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* entre otras.

Estos resultados hacen relevante el estudio de los aceites esenciales especialmente de cítricos, debido a la gran importancia que tienen para la industria farmacéutica y de alimentos. Se sabe que los aceites esenciales, utilizados como aditivos en los alimentos tienen efecto antibacteriano y actúan al mismo tiempo como saborizante. El presente trabajo determinará la actividad antibacteriana del aceite esencial y macerado de tres variedades de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck, *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación con *Citrus reticulata* y *Citrus medica* L.), mediante el método de concentración inhibitoria mínima.

**REVISIÓN DE LITERATURA**

**Plantas medicinales**

Valle (2006), indicó que las plantas han sido empleadas para aliviar los males de la humanidad desde tiempos remotos. El conocimiento empírico acerca de las plantas medicinales y sus efectos curativos se acumuló durante milenios y posteriormente pasó a ser parte de la medicina tradicional china o las tradiciones curativas de los indios norteamericanos. A partir del siglo pasado el empuje de la industria

<sup>1</sup> Tesis presentada para optar al título de Licenciada en Bioquímica y Farmacia. UCEBOL

<sup>2</sup> Tesis de la carrera Bioquímica y Farmacia. UCEBOL

farmacéutica hizo que la terapéutica fundamentada en el empleo de plantas viniera a verse como una práctica "primitiva" e irracional, en décadas recientes la fitoterapia ha experimentado un extraordinario resurgir. En la actualidad se llevan a cabo cada día descubrimientos científicos que confirman el enorme potencial curativo que posee el mundo vegetal y que están transformando la fitoterapia en una práctica muy distinta a la de nuestros antepasados.

En años recientes encontramos extractos de plantas medicinales en forma de cápsulas, tabletas y otras formas desconocidas para nuestros antecesores. La cantidad de plantas con propiedades curativas es tal que nadie puede dominar la totalidad del conocimiento de esta materia (Cobanzo *et al.*, 2005).

De acuerdo a Vander (2000) la medicina natural ha llegado a constituir en una ciencia perfectamente definida, que es practicada para:

- Curar radicalmente las enfermedades, suprimiendo sus causas.
- Evitar las enfermedades y suprimir las causas, aumentando las defensas.
- Conseguir mejorar fuerzas, resistencia, optimismo y salud en general para prolongar la juventud (Amau, 2005)

#### Formas de utilización

Las plantas se pueden utilizar de varias maneras entre ellas:

- Infusión: cuando se tiene la planta en un recipiente; se le agrega agua caliente, se mantiene durante diez minutos en ese agua y luego se cuela.
- Decocción: se hierve la planta, se cuela y se bebe
- En cataplasma: lavar bien la planta recién cortada. Se muele. La masa resultante se pone sobre el lugar afectado por el tiempo necesario. Cuando el cataplasma se seca, se bota (Vander, 2000).

#### Familia Rutaceae

De acuerdo Mahecha (1997), indica que las Rutaceae comprenden numerosas especies (cerca de 1600) en grandes partes leñosas, caracterizadas por la presencia de glándulas odoríferas que contienen esencias fuertemente aromáticas. El aparato vegetativo presenta hojas alternas y opuestas, sin estípulas. Las flores, hermafroditas, actinomorfas.

El género *Citrus*, el más importante, tiene como fruto una baya es-



Figura 1. Limón (*Citrus limón*)

Fuente: Font, 1995

Potter, (1994) indica que las partes más utilizadas son: El fruto, la cáscara y el Aceite esencial.

House *et al.*, (1998) da una descripción botánica del limón: Árbol pequeño de 6 metros de altura, con espinas largas. Hojas alternas, ovadas, 4 - 9 cm de largo, con pecíolos con alas pequeñas. Flores solitarias o en grupos. Pétalos 4 - 5, blancos o rosados. Las partes utilizadas son: Hojas, frutos, raíces y jugo.

#### Principio activo del limón (*Citrus limón*)

Potter (1994), señala que existe aceite esencial en un 2,5 % aproximadamente en la cáscara. Se encuentran principalmente en monoterpenos, están el limoneno, el mayor componente (70%), -terpineno, -pineno (terpeno) contenidos en cáscara del fruto, Mirceno, Isopulegol, bisolobeno, Sabineno, -turgeno,  $\beta$ -bisabolol. Aldehídos especialmente Citral, Sesquiterpenos (Bisboleno y Cariofileno). Cumarinas (Limetina, Bergamotina y Imperatorina). Flavonoides (citroflavonoides o bioflavonoides; es-pecialmente Natingósido, Hesperidosido, Eriodictiósido, Naringina y rutina). Vitamina C (501,6 mg/L), Ácido (49,88 g/L), Mucilago.

En el pericarpio el aceite esencial (0,2-2,5 %): Monoterpenos: limoneno (80 %),  $\gamma$ -terpinenos, paracimeno,  $\beta$  y  $\beta$ -felandrenos, terbino-leno. Sesquiterpenos. Alcoholes alifáticos. Aldehídos. Cumarinas y furanocumarinas. En la pulpa: Abundante pectina, Ácido cítrico y l-ascórbico, Carotenoides y Bisabolol ( $\beta$ -(-) - Bisabolol) (Menard, 2007).

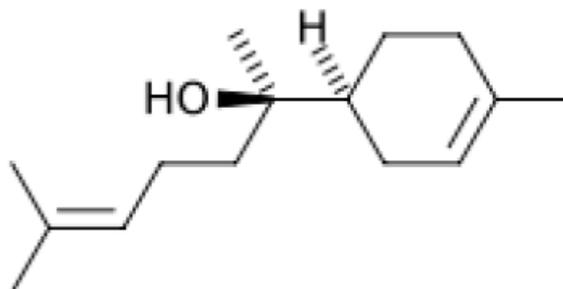


Figura 2. Bisabolol

Fuente. Menard, 2007.

l Bisabolol presenta la fórmula molecular: C 15 H 26 O (6-metil-2-((R)-4-methylcyclohex-3-enyl) hept-5-en-2-ol). Masa: 222,37 g/mol, Densidad: 0,92 g/cm<sup>3</sup>. Punto de ebullición: 153 ° C a 12 mmHg.

#### Bisabolol ( $\beta$ - bisabolol)

Conocido como levomenol. Se trata de un aceite incoloro viscoso que es el componente principal del aceite esencial. Es casi insoluble en agua y glicerina, pero muy soluble en etanol. El enantiómero,  $\beta$ -(+)- bisabolol, también se encuentra naturalmente, pero es raro.

Bisabolol tiene un débil aroma floral, dulce y se utiliza en diversas fragancias. También se ha utilizado durante cientos de años en los cosméticos, debido a su percepción de la piel propiedades curativas. Bisabolol es conocido por tener propiedades: antiinflamatorias y antimicrobianas (Menard, 2007).

#### Rutina (flavonoide)

Se lo obtiene mediante la destilación por arrastre de vapor. Sirve para combatir las alergias, infecciones bacterianas y el herpes, es

también antiinflamatoria, antiespasmódico, previene el cáncer, mejora la circulación por sus propiedades vasodilatadores, disminuye la hipertensión, mejora la digestión además ayuda a la absorción de la vitamina C impidiendo su oxidación (Maier, 2007).

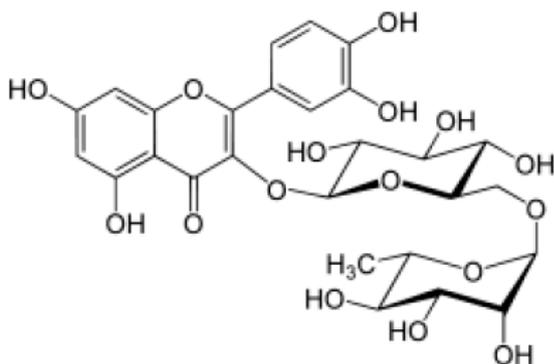


Figura 3. Rutina

Fuente. Maier, 2007.

### Naringina 7-2-O-(6-Deoxi-β-L-manopiranosil)-β-D

La naringina es un flavonoide (flavanona glicosilada) que se extrae de la cáscara del pomelo y es el principal responsable de su sabor amargo. Está presente también en la pulpa de los frutos, en hojas, flores y semillas de planta (Alain, 2000).

Algunos estudios sugieren que la biosíntesis de naringina, como la de otras flavanonas, está influenciada por factores ambientales y genéticos, determinando variaciones en los niveles de concentración de estos compuestos, estimando entre 15 - 18 gramos por Kg de cáscara fresca de pomelo como valor frecuente de concentración. Además, la cantidad en cáscara varía de mayor a menor en frutos inmaduros y maduros (Cobanzo *et al.*, 2005).

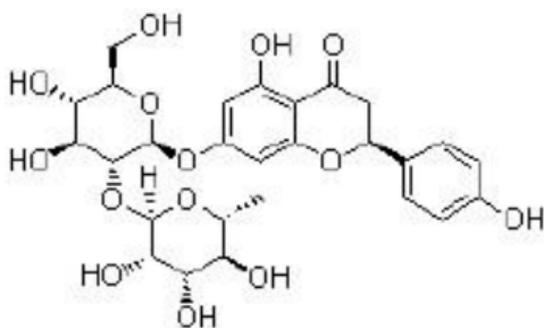


Figura 4. Naringina

Fuente. Cobanzo, 2005.

### Hesperidósido

Es un bioflavonoide que se encuentra en todo el fruto especialmente en la piel blanca que está entre la pulpa y la cáscara; protege de los problemas cardiovasculares, frena el crecimiento de células cancerígenas además que tienen capacidad antibacteriana y antiviral (García *et al.*, 2002).

### Uso terapéutico del limón (*Citrus limón*)

Los citroflavonoides (hesperidina) se utilizan contra:

- Las disfunciones vasculares, en las que la insuficiencia venosa resulta en hemorroides, venas varicosas, etc., ya que controlan la permeabilidad vascular a líquidos y proteínas al disminuir la poro-

sidad.

- Vasoprotector - capilarotropo (citroflavonoides).
- Aumenta la resistencia de la pared capilar (citroflavonoides)
- También se reporta que son antiinflamatorios (quizá por su contenido de bisabolol), antihistamínicos y diuréticos. El limón tiene una fuente de vitamina C.
- Eupéptico (aceite esencial).
- Bacteriostático (aceite esencial) obtenido por arrastre de vapor.
- Antidiarreico (pectina de la pulpa).
- Ligeramente rubefaciente, en uso tópico (aceite esencial) (Potter, 1994).
- Por su contenido en vitaminas, sales minerales, enzimas, oligoelementos y flavonoides antioxidantes es un estimulante natural de las defensas, especialmente en enfermedades infecciosas, sean de origen vírico o bacteriano (García *et al.*, 2002).

### Principios activos del limón (*Citrus aurantifolia*)

Según: Potter (1994), el aceite es volátil, y está compuesto por:

- 75 % de limoneno, como también -pineno, Sabineno, Terpinoleno, Citral,-terpineol, Linalol, -ber-gamoteno y b-bisaboleno.
  - Cumarinas, de las cuales las principales son: limetina, con bergamotita, bergapteno (=5-metoxipsoraleno), di-metoxicumarina, 8-geranoxipsoraleno isoimperatoreno, y Isopimpinella.
- De acuerdo a House *et al.*, (1998) indica que contienen:
- Hojas: d-limoneno, linalol, acetato de linalino, geraniol, etc.
  - Flores: hesperidina, esencia de azahar.
  - Corteza del fruto: d-limoneno, aldehído decílico.
  - Pulpa del fruto: hesperidina, isohesperidina, aurantiamarina, ácido hesperidínico, ácido salicílico, pectina, sacarosa, dextrosa, levulosa, etc., además abundante pectina. ácido cítrico, málico, ascórbico.

El aceite esencial debe contener no menos del 2,2 % y no más de 4,5 % de compuestos carboxílicos calculados como citral (neral y garanial). Pectina tiene un efecto hemostático local, antidiarreico y protector de la mucosa gastrointestinal (Potter, 1994).

Salinas *et al.*, (2005) mencionan que la hesperidina es un flavonoide compuesto por la flavanona hesperitina y el disacárido rutinosa (compuesto por rannmna, 6-desoxi-L-manosa, y glucosa). También se lo designa como (S)-7-[[6-O-(6-desoxi-a-L-manopiranosil)-b-D-glucopiranosil]oxi]-2,3-dihidro-5-hidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona.

Posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, hipolipídicas, vasoprotectivas y acciones anticarcinogénicas, analgésicas, antipiréticas, antibacteriana contra bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y otros.

### Propiedades biológicas y terapéuticas del limón (*Citrus aurantifolia*)

De acuerdo a Meléndez & Capriles, (1994) citado por Font, (1995), se ha mostrado la fuerte actividad antibacteriana *in vitro* de la planta *Citrus aurantifolia* contra: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Alcaligenes faecalis*,

*Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus coagulans*, *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter aerogenes*.

Según Robineau (1989), citado por House *et al.*, (1998), la decocción acuosa tiene actividad antimicótica sobre *Candida albicans* (*Epidermophyton floccosum* *Trichophyton*). El limoneno es expectorante además es antiescorbútico, refrescante. Los limones se utilizan más como saborizante que en medicina, a pesar de ser una fuente tradicional de vitamina C. Las cumarinas como el bergapteno es muy conocido debido a que causan fotosensibilización; este efecto a veces es aprovechado en la fabricación de bronceadores (House *et al.*, 1998).

Roldan (1997), indica que el limón (*Citrus aurantifolia*) es un desinfectante, usado en la disentería y afecciones gastrointestinales; también en la pleuresía, cirrosis hepática, reumatismo, jaquecas, estados biliares; con bicarbonato, cura la difteria en gárgaras, las anginas y demás afecciones de la garganta; calma los desequilibrios nerviosos; ingerido en ayunas, el jugo de limón es indicado para los artríticos y los que tienen la tensión arterial alta. Destruye los microbios y es usado para lavar heridas y llagas; alivia las picaduras de insectos, como abejas y avispas.

El jugo corta los vómitos, cura los catarros, tonifica el estómago. La raíz es buena en tisanas antigonorreicas; la corteza de la raíz en infusión combate las fiebres. Las flores y las hojas son un buen antiespasmódico, en infusión. Las hojas también se usan en baños. La pulpa de los frutos se usa externamente para curar heridas y úlceras; las semillas trituradas con azúcar son antihelmínticas y sin triturar contiene aceites esenciales con propiedad antibacteriana (Rojas, 2000).

#### Estudios de la actividad antibacteriana del limón

##### Concentración de flavonoides en el limón (*Citrus aurantifolia*) naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y Pomelo (*Citrus paradisi*)

De acuerdo a García *et al.*, (2002) indica que los flavonoides están presentes en casi todas las plantas, fundamentalmente en las partes aéreas, pero varían cualitativamente de una planta a otra.

**Cuadro 1. Concentraciones de flavonoides (mg/100 mg de peso seco) en diferentes partes del limón (*Citrus aurantifolia*)**

Flavonoide	Limón		
	Hoja	Fruto	Jugo
Rutina	591,3	22,7	<10
Hesperidina	<10	358,0	384,0
Naringina	<10	<10	<10
Diosmina	204,0	73,2	<10

Fuente: García *et al.*, 2002

#### Capacidad antimicrobiana de subproductos cítricos de limón, Naranja y Mandarina frente a los patógenos alimentarios *Es-*

#### *cherichia coli* 0157:H7 y *Salmonella typhimurium*.

Investigadores e industriales trabajan en el desarrollo de nuevas formulaciones y procesos que garanticen la calidad y la seguridad de los alimentos. En el ámbito de las nuevas formulaciones, los subproductos de la industria alimentaria representan una potencial fuente de materias primas económicas, y ricas en componentes bioactivos, cuyas propiedades tecnológicas y antimicrobianas se encuentran todavía escasamente estudiadas.

El objetivo del presente estudio es evaluar las propiedades antimicrobianas de tres subproductos cítricos; mandarina, naranja y limón, frente a dos patógenos de especial interés para la industria agroalimentaria *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*

De los resultados obtenidos se concluye que todos los subproductos presentan efecto bacteriostático y/o bactericida bajo las condiciones estudiadas, siendo el subproducto de mandarina y limón los más efectivos. Pudiendo actuar como barrera a la proliferación microbiana, adicionados, por ejemplo, a bebidas pasteurizadas, prolongando la vida útil de las mismas en refrigeración, contribuyendo además a cumplir con objetivos de residuo cero marcados por la Unión Europea (Foronda *et al.*, 2009).

#### Acción antibacteriana del limón y salsa sobre el Ostión *Crassostrea virginica* de la laguna de Mandinga, Veracruz

El ostión americano (*Crassostrea virginica*) se distribuye en los estuarios y cuerpos de agua salina del continente americano. Es una especie de gran importancia económica, por ser un producto comestible y con fama de tener propiedades afrodisíacas. Comúnmente se consume directamente de la concha. Sin embargo conlleva a ciertas repercusiones para la salud humana, debido al contenido de bacterias, algunas de ellas patógenas.

Este trabajo pretendió determinar si existe un efecto antibacteriano del limón y salsa al agregarlos al ostión antes de comerlo, por esto sugerimos que el limón y la salsa pueden inhibir las bacterias en un 50 %. Se compraron ostiones recién extraídos por pescadores en Mandinga, Veracruz. En laboratorio se extrajeron los ostiones de las conchas y cada uno fue dividido en 4 partes. Se separó 1 gramo, de cada una de las partes y se maceró, después se diluyó en 9 ml de agua desionizada. Las diluciones se organizaron en cuatro series de 3 tubos:

- Serie 1: control (C1, C2 y C3).
- Serie 2: con 1 ml de jugo de limón (L1, L2 y L3).
- Serie 3: 1 ml de salsa (S1, S2 y S3).
- Serie 4: con 1ml de salsa y limón (SL1, SL2 y SL3).

Se sembraron las cuatro series en cajas Petri con dos agares: McConckey y *Salmonella-Shigella*, manteniéndolos en incubación 35 °C, durante 48 horas. Se comprobó la presencia de bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella* en los ostiones, encontrando que el efecto de la salsa y el limón contrarrestan el crecimiento de las bacterias, si el número de éstas no sea alto (Ojeda *et al.*, 2010).

#### Actividad antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de Pica

Se estudiaron seis cáscaras de frutos que fueron colectadas a 114 kilómetros al interior de Iquique, en el oasis de Pica de los siguientes frutos:

- Tángelo (híbrido de *Citrus reticulata* con *Citrus paradise*)

- Mango (*Mangifera Indica*)
- Naranja (*Citrus sinensis*)
- Guayaba (*Psidium guajava*)
- Pomelo (*Citrus grandis*)
- Limón (*Citrus aurantifolia*)

### Obtención de los extractos acuosos

Las cáscaras de los frutos en estudio, fueron molidas en un mortero, y se pesaron en una balanza analítica 2 gramos de cáscaras frescas y liofilizadas por separado en un vaso precipitado. Se le agregó 200 mL de agua hervida calentado en un baño termostático dejándola reposar por 3 minutos. Se filtró en caliente, obteniéndose soluciones al 1 % que se almacenaron a temperatura de 0 a 4 °C en frascos ámbar.

### Determinación de la actividad antibacteriana

Para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos vegetales, las cepas fueron sembradas previamente en agar Tripticosa de Soya Merck, (24 horas antes). Luego se picaron de 3 a 5 colonias y se inocularon en tubos conteniendo 3 mL de caldo Tripticosa de Soya Merck, incubándose en estufa de cultivo. La densidad bacteriana fue ajustada aproximadamente a  $1.5 \times 10^8$  bacteria/mL usando la escala de MacFarland.

Se inocularon las placas de agar Muller-Hinton Merck con cada cepa evaluada. Simultáneamente se prepararon discos estériles a los cuales se les adicionó de 100 - 400  $\mu$ L de los extractos vegetales.

Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas. Luego se determinó la formación de halos de inhibición. Las cepas bacterianas utilizadas en este ensayo fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium*.

**Resultados:** Los extractos de las cáscaras de las frutas fueron evaluados para determinar la actividad antibacteriana frente a dos cepas gramnegativas y dos cepas grampositivas.

Los extractos de mango y guayaba presentaron actividad frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Frente a *Enterococcus faecalis* el extracto de cáscara de mango y guayaba presentaron actividad. Frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sólo el extracto de Limón presentó actividad antibacteriana.

Los altos contenidos de polifenoles (Flavonoides, flavonas) son los responsables de la actividad antibacteriana. Los polifenoles representan uno de los componentes abundantes en las cáscaras de las especies vegetales mencionadas; estos compuestos tienen funciones de defensa en la planta, como agentes antimicrobianos, protección contra herbívoro (Foronda *et al.*, 2009).

### Propiedades antibacterianas de las cáscaras de limón y naranja, en diferentes estados de maduración, sobre diversos microorganismos

El limón (*Citrus limón*) y el naranjo (*Citrus sinensis*), son especies que poseen una amplia distribución a lo ancho de todo el mundo, abarcando su cultivo, lugares tan distantes como Europa y Asia, así como también en buena parte del continente americano, hoy en día se les clasifica dentro de la familia Rutaceae.

El objetivo principal de este estudio es comprobar si la cáscara de los frutos de *Citrus limón* y *Citrus sinensis*, que es en principio la

primera barrera de defensa contra el mundo exterior, posee propiedades antimicrobianas sobre miembros de siete géneros bacterianos que poseen gran importancia clínica, debido a su afinidad por causar infecciones en el ser humano. Estas bacterias son *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Listeria monocytogenes*.

Los resultados obtenidos, muestran que los extractos obtenidos a partir de la cáscara de naranja y limón, poseían actividad antibacteriana frente a 5 cepas. Estas cepas correspondieron a las especies *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli*. Es importante señalar de que, aunque resultan interesantes los resultados obtenidos, es necesario elaborar estudios más profundos que permitan identificar y purificar los agentes químicos responsables con actividades antibacterianas (Cerdeña & Espinosa, 2007).

### MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Cristiana de Bolivia (UCEBOL). La duración de esta investigación de tipo experimental y transversal fue de Agosto a Octubre del 2013.

Se estudiaron las variedades de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck, *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación con *Citrus reticulata* y *Citrus medica* L.) que es de gran consumo en nuestra ciudad.

Las muestras (cáscara, semilla y hoja) fueron obtenidas del mercado de La Ramada de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra. Posteriormente se realizó el estudio taxonómico de las plantas por el Museo de botánica Noel Kempff Mercado, certificando la familia y especie.

Cuadro 2. Variedades y nombre científico de las plantas

VARIETADES	NOMBRE CIENTÍFICO
Variedad 1	<i>Citrus limón</i> (L) Osbeck
Variedad 2	<i>Citrus limón</i> (L) Osbeck en combinación <i>Citrus reticulata</i> (mandarina)
Variedad 3	<i>Citrus medica</i> (L)

Fuente: Anexo 5

### Conducción del estudio

#### - Obtención del aceite por el método de destilación de arrastre de vapor

Para obtener el aceite esencial de: hojas, cáscara y semilla de limón se utilizó el método de destilación por arrastre de vapor.

Las diferentes partes de los frutos que se utilizaron debido a sus componentes activos con propiedades antibacterianas son:

- Semillas enteras del fruto, debido a que existe mayor concentración del principio activo (hesperidina y naringina) (Maier, 2007).
- Cáscara del fruto por contener glucósido flavónico (hesperidina) (Maier, 2007).
- Hojas, contiene principios activos como diosmina, rutina, hesperidina y naringina (García *et al.*, 2002).

#### - Obtención de la maceración

· Se obtuvieron macerados de las hojas, cáscara y semilla de limón de frutos maduros.

- El macerado fue realizado pesando 500 gramos (hoja, semilla y cáscara) en 200 mL de alcohol absoluto.
- La maceración fue realizada por 2 días.

#### - Determinación de la actividad antibacteriana

Se determinó la actividad antibacteriana del macerado (obtenido por maceración) y del aceite esencial (obtenido por el destilado de arrastre de vapor), mediante el método de la concentración inhibitoria mínima, en la cual se utilizó las siguientes cepas:

**Cepas ATCC** (American Type Culture Collection) (Sobrado, 2000)

- *Staphylococcus aureus* 25923
- *Escherichia coli* 25922

Las cepas ATCC fueron reconstituido en medios apropiados:

- *Staphylococcus aureus* en agar Sangre
- *Escherichia coli* en agar MacConkey

#### Actividad antibacteriana

Se preparó un inóculo de las cepas ATCC utilizando como diluyente 10 mL de solución salina hasta que la turbidez sea similar al tubo 5 de la escala de Mac Farland (1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL).

Del aceite esencial obtenido por el método de destilación de arrastre de vapor se obtuvieron 100 µL. De los macerados se obtuvieron 2 mL. Posteriormente se utilizó el método de concentración inhibitoria mínima.

Posteriormente se determinó la actividad antibacteriana del aceite esencial y del macerado en los tubos que no presente turbidez. Adicionalmente se realizó la siembra de los tubos sin turbidez en medios respectivos de acuerdo a las bacterias a determinar.

#### Variables a estudiar

Variedades de hoja y fruto en estudio

- Variedad 1 *Citrus limón* (L) Osbeck 0
- Variedad 2 *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación *Citrus reticulata* (mandarina) 0
- Variedad 3 *Citrus médica* (L)

Método de obtención del aceite esencial y del macerado

- Destilación por arrastre de vapor
- Maceración

Partes a utilizar de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck, *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación con *Citrus reticulata* y *Citrus medica* L.)

- Cáscara
- Semilla de fruto 0
- Hoja

Tipo de bacteria con sensibilidad frente al aceite esencial y macerado

- *Staphylococcus aureus* 25923 0
- *Escherichia coli* 25922

#### Análisis estadístico

Para determinar la importancia estadística de los resultados de los diferentes extractos se aplicará el método descriptivo, mediante cuadros y cruce de variables.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actividad antibacteriana del aceite esencial y macerado del limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) variedad 1 frente a *Staphylococcus aureus*

El aceite esencial proveniente de la hoja y cáscara del fruto de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) presentó actividad antibacteriana y no presentó actividad en semilla del fruto.

El macerado obtenido de las diferentes partes de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) presentó actividad antibacteriana de la hoja y cáscara del fruto y no presentó actividad en semilla del fruto.

### Cuadro 3. Actividad antibacteriana del aceite esencial y macerado del limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) variedad 1 frente a *Staphylococcus aureus*

Variedad 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	ACEITE ESENCIAL	MACERADO
Cáscara	1	1
Semilla del fruto	2	2
Hoja	1	1

1.- Con actividad antibacteriana 2.- Sin actividad antibacteriana

Fuente: Elaboración propia

Los resultados obtenidos muestran que el aceite obtenido de la cáscara y hoja no presentó desarrollo bacteriano debido a que la naringina (P.A.) se encuentra en mayor proporción en esa parte del fruto lo que se relaciona con Maier (2007). Uno de los flavonoides más importantes del limón es la naringina (que se transforma en el organismo en naringenina), de propiedades fluidificantes de la sangre, antioxidantes y anticancerígenos, antibacterianas para bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus*) así como bacterias gramnegativas.

El macerado de cáscara y hoja de limón de la variedad 1 presentó actividad antibacteriana debido a que contiene componentes activos frente a bacterias.

### Actividad antibacteriana del aceite esencial y macerado del limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) en combinación con mandarina (*Citrus reticulata*) variedad 2 frente a *Staphylococcus aureus*

El aceite esencial proveniente de la hoja y cáscara del fruto de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) en combinación con mandarina (*Citrus reticulata*) presentó actividad antibacteriana y no presentó actividad en semilla del fruto.

El macerado obtenido de las diferentes partes del fruto de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) en combinación con mandarina (*Citrus reticulata*) presentó actividad antibacteriana de la hoja y no presentó actividad en semilla y cáscara del fruto.

**Cuadro 4. Actividad antibacteriana del aceite esencial y macerado del limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) en combinación con mandarina (*Citrus reticulata*) en combinación con mandarina (*Citrus reticulata*) variedad 2 frente a *Staphylococcus aureus***

Variedad 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	ACEITE ESENCIAL	MACERADO
Cáscara	1	2
Semilla del fruto	2	2
Hoja	1	1

1.- Con actividad antibacteriana 2.- Sin actividad antibacteriana

El aceite esencial del limón (*Citrus limón*) presenta el principal principio activo que es la hesperidina; actúa mayormente sobre bacterias grampositivas y escasamente sobre las gramnegativas. Estos resultados son confirmados por García *et al.*, (2002) que indica que la hesperidina son los principales flavonoides que actúan sobre bacterias grampositivas presentes en la cáscara y hojas de la planta.

En el macerado solo la hoja del limón (variedad 2) presentó actividad antibacteriana debido a sus componentes como la hesperidina y naringina.

**Actividad antibacteriana del aceite esencial y macerado del limón (*Citrus medica* L.) variedad 3 frente a *Staphylococcus aureus***

El aceite esencial proveniente de la hoja y cáscara de limón (*Citrus medica* L.) presentó actividad antibacteriana y no presentó actividad en semilla del fruto.

El macerado obtenido de las diferentes partes de limón (*Citrus medica* L.) no presentó actividad antibacteriana de la hoja, semilla y cáscara del fruto.

**Cuadro 5. Actividad antibacteriana del aceite esencial y macerado del limón (*Citrus medica* L.) variedad 3 frente a *Staphylococcus aureus***

Variedad 3	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	ACEITE ESENCIAL	MACERADO
Cáscara	1	2
Semilla del fruto	2	2
Hoja	1	2

1.- Con actividad antibacteriana 2.- Sin actividad antibacteriana

Estos resultados son comparables a los de Dabbah *et al.*, (2002) citado por Martínez *et al.*, (2003), donde los aceites esenciales de cítricos presentaron mayor actividad antibacteriana frente a cepas bacterianas como *Staphylococcus aureus*.

Los resultados obtenidos del macerado de limón (*Citrus medica* L.) demuestran que no presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, esto se debe principalmente a que no contiene componentes activos frente a bacterias grampositivas.

**Actividad antibacteriana del aceite esencial y macerado del limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) variedad 1 frente a *Escherichia coli***

El aceite esencial proveniente de cáscara y semilla del fruto de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) no presentó actividad antibacteriana y si presentó en hojas de limón.

El macerado obtenido de las diferentes partes de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) no presentó actividad antibacteriana en hoja, cáscara y semilla de limón.

**Cuadro 6. Actividad antibacteriana del aceite esencial y macerado del limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) variedad 1 frente a *Escherichia coli***

Variedad 1	<i>Escherichia coli</i>	
	ACEITE ESENCIAL	MACERADO
Cáscara	2	2
Semilla del fruto	2	2
Hoja	1	2

1.- Con actividad antibacteriana 2.- Sin actividad antibacteriana

Las cepas de *Escherichia coli* no resultaron inhibidas en su crecimiento por el aceite esencial obtenido por destilación de arrastre de vapor. Estos resultados son comparables a los de Martínez *et al.*, (2003) que indica que los principios activos de naringina y rutina actúan en mayor proporción sobre bacterias grampositivas y su actividad es escasa sobre las gramnegativas debido a que este tipo de bacterias son oportunistas cuando el sistema inmune está deprimido.

García *et al.*,(2002), indicó que los flavonoides más importantes del limón son la naringina, rutina y diosmina que poseen actividad antibacteriana contra las bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus*) y muy escasamente sobre las gramnegativas.

El macerado de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) no presentó actividad antibacteriana debido a que no contiene componentes activos frente a bacterias gramnegativas.

**Actividad antibacteriana del aceite esencial y macerado del limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) en combinación con mandarina (*Citrus reticulata*) variedad 2 frente a *Escherichia coli***

El aceite esencial proveniente de la hoja y cáscara de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) en combinación con mandarina (*Citrus reticulata*) presentó actividad antibacteriana y no presentó actividad en semilla del fruto.

El macerado obtenido de las diferentes partes de limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) en combinación con mandarina (*Citrus reticulata*) no presentó desarrollo bacteriano de la hoja, cascara y semilla de limón.

**Cuadro 7. Actividad antibacteriana del aceite esencial y macerado del limón (*Citrus limón* (L) Osbeck) en combinación con mandarina (*Citrus reticulata*) variedad 2 frente a *Escherichia coli***

Variedad 2	<i>Escherichia coli</i>	
	ACEITE ESENCIAL	MACERADO
Cáscara	1	2
Semilla del fruto	2	2
Hoja	1	2

1.- Con actividad antibacteriana 2.- Sin actividad antibacteriana

Estos resultados obtenidos se relacionan con Salinas *et al.*, (2005) que mencionan que el flavonoide hesperidina está compuesto por la flavanona, hesperidina presente en limones, pomelo y naranjas, que posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, hipolípicas, vasoprotectivas y analgésicas, antipiréticas, antibacteriana contra bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y otros.

**Actividad antibacteriana del aceite esencial y macerado del limón (*Citrus medica* L.) variedad 3 frente a *Escherichia coli***

El aceite esencial proveniente de la hoja y cáscara de limón (*Citrus medica* L.) presentó actividad antibacteriana y no presentó actividad en semilla del fruto.

El macerado obtenido de las diferentes partes de limón (*Citrus medica* L.) no presentó desarrollo bacteriano de la hoja y no presentó actividad en semilla y cáscara del fruto.

**Cuadro 8. Actividad antibacteriana del aceite esencial y macerado del limón (*Citrus medica* L.) variedad 3 frente a *Escherichia coli***

Variedad 3	<i>Escherichia coli</i>	
	ACEITE ESENCIAL	MACERADO
Cáscara	1	2
Semilla del fruto	2	2
Hoja	1	2

1.- Con actividad antibacteriana 2.- Sin actividad antibacteriana

El limón (*Citrus medica* L.) posee actividad bactericida, gracias a hesperidina y naringina presente en la cascara del fruto y hoja, el cual es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias grampositivas y gramnegativas, principalmente sobre *Escherichia coli*, siendo carente de efectos secundarios para la salud.

**CONCLUSIONES**

- Se obtuvieron el aceite esencial por destilación de arrastre de vapor, así como también el macerado provenientes de cáscara, semilla y hoja de limón.
- Las tres variedades del limón (*Citrus limón*) son, variedad 1 (*Citrus limón* (L) Osbeck), variedad 2 (*Citrus limón* (L) Osbeck en combinación *Citrus reticulata*) y variedad 3 (*Citrus medica* (L)). La

variedad 1 presenta mayor cantidad de principio activo con mayor actividad antibacteriana.

- *Staphylococcus aureus* frente al aceite esencial obtenido de la hoja y cáscara de la variedad *Citrus limón* (L) Osbeck presentó actividad antibacteriana. El macerado presentó actividad antibacteriana de la hoja y cáscara del fruto.

- El aceite esencial de hoja y cáscara del fruto de la variedad *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación *Citrus reticulata* presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y no presentó actividad en semilla del fruto. El macerado presentó actividad antibacteriana de la hoja y no de semilla y cáscara del fruto.

- El aceite esencial proveniente de hoja y cáscara de la variedad *Citrus medica* (L) frente a *Staphylococcus aureus* presentó actividad antibacteriana y no presentó actividad en semilla del fruto. El macerado no presentó actividad antibacteriana de la hoja, semilla y cáscara del fruto.

- El aceite esencial de cáscara y semilla del fruto de la variedad *Citrus limón* (L) Osbeck no presentó actividad antibacteriana y si presentó en hojas de dicho fruto. El macerado obtenido no presentó actividad antibacteriana en hoja, cáscara y semilla del fruto frente a *Escherichia coli*.

- El aceite esencial de hoja y cáscara del fruto de la variedad *Citrus limón* (L) Osbeck en combinación *Citrus reticulata* presentó actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y no presentó actividad en semilla del fruto. El macerado obtenido no presentó actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*.

- El aceite esencial de hoja y cáscara del fruto de la variedad *Citrus medica* (L) presentó actividad antibacteriana y no presentó actividad en semilla del fruto. El macerado obtenido no presentó actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

- La variedad 1 presenta con mayor frecuencia actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* en macerado y aceite esencial de la cascara y hoja de limón (*Citrus limón*).

- Los resultados obtenidos demuestran que el aceite esencial posee componentes con actividad antibacteriana de las tres variedades y con mayor actividad frente a *Staphylococcus aureus*, de acuerdo a estudios realizados por diferentes investigadores son bacteriostáticos y bactericidas.

**RECOMENDACIONES**

- El limón podría ser una alternativa para el tratamiento de infecciones bacterianas en el futuro siempre y cuando se realicen estudios clínicos en pacientes con diferente patología, evaluando parámetros clínicos y bacteriológicos lo cual confirmaran la eficacia obtenida de manera *in-Vitro*.

- Se deberá realizar pruebas de comparación del Limón en diferentes zonas geográficas de Bolivia, la finalidad es clasificarlos según el grado de actividad antimicrobiana, considerando que Bolivia es uno de los países con mayor riqueza en su tierra fértil lo cual colabora a la diversidad de su flora.

- Es de trascendental importancia que las instituciones e industrias farmacéuticas apoyen a las investigaciones lo cual servirá de gran utilidad para obtener nuevos principios activos con propiedad antibacteriana, especialmente para evitar la resistencia y reacciones adversas producidas por los antibió-

ticos en el hombre.

- Diseñar formulaciones farmacéuticas sólidas aumentando así las posibilidades de introducción al mercado, el que serviría para las personas que sufren con la resistencia a antibióticos.

#### RECOMENDACIONES

- El limón podría ser una alternativa para el tratamiento de infecciones bacteriana en el futuro siempre y cuando se realicen estudios clínicos en pacientes con diferente patología, evaluando parámetros clínicos y bacteriológicos lo cual confirmarían la eficacia obtenida de manera *in-Vitro*.
- Se deberá realizar pruebas de comparación del Limón en diferentes zonas geográficas de Bolivia, la finalidad es clasificarlos según el grado de actividad antimicrobiana, considerando que Bolivia es uno de los países con mayor riqueza en su tierra fértil lo cual colabora a la diversidad de su flora.
- Es de trascendental importancia que las instituciones e industrias farmacéuticas apoyen a las investigaciones lo cual servirá de gran utilidad para obtener nuevos principios activos con propiedad antibacteriana, especialmente para evitar la resistencia y reacciones adversas producidas por los antibióticos en el hombre.
- Diseñar formulaciones farmacéuticas sólidas aumentando así las posibilidades de introducción al mercado, el que serviría para las personas que sufren resistencia a antibióticos.

#### BIBLIOGRAFÍA (RESUMEN)

- **ALAIN, H. 2000.** Plantas medicinales de Puerto Rico y el Caribe. 1ª Edic. Edit. Iberoamericana. Puerto Rico. 566 pag.
- **ARNAU, J. 2005.** Plantas medicinales y sus Propiedades Curativas. Revisado en: 28/04/08. Disponible: [www. Enbuenasmanos.com](http://www.Enbuenasmanos.com).
- **BALBACH, A. 1998.** Las frutas en la medicina natural. 1ª Edic. Buenos Aires-Argentina.458 pag.

- **CERDA, C. & P. ESPINOZA. 2007.** Propiedades antibacterianas de las cascaras de limón y naranja, en diferentes estados de maduración, sobre diversos microorganismos. Biblioteca Universidad de Talca (Chile) Facultad de Ciencias de la Salud. Memoria de pregrado Tecnología Médica.
- **CERVANTES, E. 2008.** Las hiervas. Medicinales. Revisado:20/08/08.Disponible en: [www.Hierbitas.com](http://www.Hierbitas.com).
- **COBANZO, A; E. MONCADA, A. REY, D. CHAMARRRO & F. DURAN. 2005.** Manual curativo con fruta y plantas medicinales. 3ª Edic. . Edit. Grupo Latin. Colombia 700 pag.
- **FONT, P. 1995.** Plantas medicinales. 15ª Edic. Edit. Labor S.A. Barcelona-España.1033 pag.
- **FORONDA C., M. DOLORES; R. ALIAGA; A. LÓPEZ & M. PÉREZ. 2009.** Capacidad antimicrobiana de subproductos *Cítricos de limón, Naranja Y Mandarina* frente a *Escherichia coli 0157:H7* y *Salmonella Typhimurium*. Master en ciencia e ingeniería de los alimentos. Universidad Politécnica de Valencia.
- **GARCÍA, M; D. ARMENTEROS, M. MAHÍA, C. COMA, J. HERNÁNDEZ, A. DÍAZ & J. FERNÁNDEZ. 2002.** Plantas cítricas en el tratamiento de enfermedades vasculares. Revisado en: 13/08/08. Disponible en: [www. bvs.sld.cu](http://www.bvs.sld.cu).
- **HOUSE, P; S. LAGOS, L. OCHOA, C. TORRES, T. MEJIA & M. RIVAS. 1998.** Plantas Medicinales comunes de Honduras. Laboratorio histología y etnobotánica. 555 pag.
- **MAHECHA, G. 1997.** Fundamentos y Metodología para la identificación de las plantas. Santa Fe de Bogotá-Colombia.282 pag.
- **MAIER, C. 2007.** Compuestos activos de la naranja. Revisado: 3/05/08. Disponible en: [www.botanica-online.com](http://www.botanica-online.com).

# Compite Med 9

## Respuesta

### CASO CLINICO N° 1 (DE LA PAGINA 13)

#### Coriorretinitis tuberculosa primaria.

Entre los antecedentes cuenta madre con esclerosis múltiple y padre con antecedentes de tuberculosis pulmonar. Es una enfermedad poco frecuente, con una incidencia de 1% de impacto no bien reconocido. Puede comprometer cualquier componente del sistema visual. La mayoría no tienen historia de enfermedad pulmonar o sistémica. Radiografía normal en un 50% de los casos