

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE NARANJA (*Citrus sinensis*) SOBRE LA CEPA DE
Staphylococcus aureus”**

**“Documento Final del Proyecto de Investigación como requisito para obtener el
grado de Médico Veterinario Zootecnista”**

DIANA ESTEFANÍA SAQUINGA CONSTANTE

AUTOR

Dr. MARCO ROSERO PEÑAHERRERA, Mg

TUTOR

Cevallos – Ecuador

2018

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE NARANJA (*Citrus sinensis*) SOBRE LA CEPA DE
Staphylococcus aureus”**

**“Documento Final del Proyecto de Investigación como requisito para obtener el
grado de Médico Veterinario Zootecnista”**

DIANA ESTEFANÍA SAQUINGA CONSTANTE

AUTOR

Dr. MARCO ROSERO PEÑAHERRERA, Mg

TUTOR

Cevallos – Ecuador

2018

“La suscrita, DIANA ESTEFANÍA SAQUINGA CONSTANTE, portadora de la cédula de identidad número: 180520795-6, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE NARANJA (*Citrus sinensis*) SOBRE LA CEPA DE *Staphylococcus aureus*” es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas”.

.....
Diana Estefanía Saquina Constante

180520795-6

DERECHO DEL AUTOR

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE NARANJA (*Citrus sinensis*) SOBRE LA CEPA DE *Staphylococcus aureus*” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizó a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él”.

.....

Diana Estefanía Saquina Constante

180520795-6

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE NARANJA (*Citrus sinensis*) SOBRE LA CEPA DE
Staphylococcus aureus”**

REVISADO POR:

.....

Dr. Marco Rosero Peñaherrera, Mg

TUTOR

.....

Dr. Pedro Díaz, Mg

ASESOR DE BIOMETRÍA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN:

FECHA

.....

.....

Ing. Mg. Hernán Zurita Vásquez

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

.....

Dr. William Calero, PhD

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

.....

Dra. Sandra Cruz, PhD

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

AGRADECIMIENTO

A Dios por brindarme una segunda oportunidad de vivir y así lograr lo que con tanto anhelo soñaba e inicie a construir hace años atrás.

A la Universidad Técnica de Ambato que me recibió con los brazos abiertos permitiéndome formar parte de la institución, para poder crecer y desarrollarme profesionalmente en todos los ámbitos.

A mis docentes: Dr. Marco Rosero, Dra. Mayra Montero, Dr. Pedro Díaz, los cuales me guiaron con paciencia durante la investigación, mediante sus conocimientos científicos y valores morales.

A mi familia por ser un pilar fundamental de apoyo, guiarme y brindarme consejos en todo momento.

A mis amigos con los que compartí esta etapa de mi vida dentro del aula y fuera de ella, brindándome una mano amiga en los momentos difíciles, con sus locuras y ocurrencias lograron ser positivos en cualquier circunstancia, enseñándome que el darnos por vencidos no era una opción, que con esfuerzo y tenacidad se puede llegar a la meta. Son la familia que elegí, la que me regalo momentos invaluable y que siempre llevare en mi corazón.

“Vive como si fueras a morir mañana, Aprende como si fueras a vivir por siempre”

DEDICATORIA

A Dios porque a través de su palabra y guía me encamino a ser una mejor persona, me enseñó que “la persona que no vive para servir, no sirve para vivir”.

A mi madre por su valentía y tenacidad al sacarme adelante sola y que a pesar de su cansancio siempre me brindo una sonrisa al final del día, con cada palabra de aliento y consejos me ayudo a levantarme cuando sentía que no podía seguir, mi motivo de vida, mi fuerza.

A la memoria de mi hermano y mi tío, mis ángeles de la guarda que desde el cielo me bendicen y me miran con felicidad al culminar una de mis metas.

A mi tío Wilson Constante por ser un reflejo paterno y apoyo cuando más lo necesitaba.

Diana Estefanía Saquina Constante

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPITULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO II	3
REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	3
2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL.....	13
2.2.1. Cítricos (<i>Citrus spp.</i>).....	13
2.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.2.3. Pruebas <i>in vitro</i>	17
CAPITULO III.....	20
3.1. HIPÓTESIS	20
3.2. OBJETIVOS.....	20
3.2.1. OBJETIVO GENERAL.....	20
3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
CAPITULO IV.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	21
4.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR	21
4.3. EQUIPOS Y MATERIALES	21
4.3.1. Material Químico	21
4.3.2. Material Biológico	21
4.3.3. Reactivos	22
4.3.4. Equipos y Material de Laboratorio	22
4.4. FACTORES EN ESTUDIO	23
4.4.1. Concentraciones	23
4.4.2. Ceba bacteriana	23

4.5.	TRATAMIENTOS	23
4.6.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
4.7.	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	25
4.7.1.	Obtención del material biológico	25
4.7.2.	Obtención del Aceite Esencial de Naranja.....	25
4.7.3.	Elaboración de los medios de cultivo.....	26
4.7.4.	Activación de la cepa	26
4.8.	VARIABLE RESPUESTA	27
4.8.1.	Determinación de la Concentración Mínima inhibitoria (CMI)	27
4.8.2.	Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)	27
4.8.3.	Método de Difusión en Disco y Medición de los Halos de Inhibición	28
4.9.	PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.....	28
CAPITULO V		28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		29
5.1.	RESULTADOS	29
5.1.1.	Concentración Mínima Inhibitoria.....	29
5.1.2.	Concentración Mínima Bactericida	30
5.1.3.	Halos de Inhibición	31
5.2.	DISCUSIÓN.....	31
CAPÍTULO VI.....		33
CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA, ANEXOS.....		33
6.1.	CONCLUSIONES.....	33
6.2.	BIBLIOGRAFÍA.....	34
6.3.	ANEXOS.....	43
CAPITULO VII		47
PROPUESTA.....		48
7.1.	DATOS INFORMATIVOS	48

7.2.	ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA	48
7.3.	JUSTIFICACIÓN.....	48
7.4.	OBJETIVOS.....	49
7.5.	ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD	49
7.6.	FUNDAMENTACIÓN	49
7.7.	METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO.....	49
7.8.	ADMINISTRACIÓN	50
7.9.	PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN	50

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Taxonomía de la Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	13
TABLA 2.	Taxonomía de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
TABLA 3.	Información del Lugar del Experimento.....	21
TABLA 4.	Esquema de los tratamientos.....	24
TABLA 5.	Preparación de las concentraciones del Aceite Esencial de Naranja (<i>Citrus sinensis</i>).....	25
TABLA 6.	Concentración Mínima Inhibitoria del Aceite Esencial de Naranja (<i>Citrus sinensis</i>).....	29
TABLA 7.	Concentración Mínima Bactericida del Aceite Esencial de Naranja (<i>Citrus sinensis</i>).....	30
TABLA 8 .	Halos de sensibilidad (mm) del Aceite Esencial de Naranja (<i>Citrus sinensis</i>).....	31

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Obtención del Aceite Esencial de Naranja (<i>Citrus sinensis</i>) con el Método de Destilación por Arrastre de Vapor.....	43
ANEXO 2. Siembra de <i>Staphylococcus aureus</i> en Agar Sal Manitol mediante estriación.	44
ANEXO 3 . Concentración del Aceite Esencial de Naranja al 10%, 30%, 50%, 70% y 90%.	44
ANEXO 4. Impregnación de los Discos Oxoid con las diferentes concentraciones de Aceite Esencial de Naranja (<i>Citrus sinensis</i>).	44
ANEXO 5. Distribución de los Discos de Sensibilidad a distintas concentraciones del Aceite Esencial de Naranja (<i>Citrus sinensis</i>) sobre el Agar Mueller Hinton.....	45
ANEXO 6. Incubación de placas durante 24 horas.....	45
ANEXO 7. Formación de Halos de Sensibilidad al 50%, 70%, 90%.....	45
ANEXO 8. Diámetro de los Halos de inhibición (mm) de <i>Staphylococcus aureus</i> . .	46
ANEXO 9. Análisis de Varianza de los halos de sensibilidad del Aceite Esencial de Naranja (<i>Citrus sinensis</i>) en <i>Staphylococcus aureus</i>	46
ANEXO 10. Prueba Tukey al 5% de los halos de sensibilidad (mm).....	46
ANEXO 11. Concentración Mínima Inhibitoria al 50%, 70%, 90% a las 2 horas. ...	46
ANEXO 12. Concentración Mínima Bactericida al 50%, 70%, 90% a las 24 horas.	47

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) sobre la cepa de *S. aureus* ATCC® 25904. La misma que se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato. El aceite esencial de naranja (AEN), se obtuvo por el método arrastre de vapor. Las concentraciones evaluadas fueron 10%, 30%, 50%, 70%, 90% del aceite esencial de naranja, diluidas en agua peptonada y tween 80 como agente tensioactivo. Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se utilizó el método de microdilución en caldo, observando los resultados a las 0, 2, 4, 6 y 24 horas desde su incubación a 37°C. La inhibición del crecimiento bacteriano fue observada entre la concentración al 30% y 50%. Se determinó la Concentración Mínima Bactericida (CMB) la cual mostró resultados positivos a las 24 horas al no presentar crecimiento de *S. aureus*, se encuentra entre la concentración de 30% y 50%. La prueba de sensibilidad mostró resultados de inhibición a partir de concentraciones al 50%, al presentar zonas de inhibición de 11,16 mm; 11,26 mm y 14,84 mm respectivamente; se concluye que los tratamientos al 50%, 70% y 90% son efectivos, siendo el 50% y 70% estadísticamente iguales ($p < 0,05$). Por lo tanto muestra una similar eficacia. Mientras la concentración al 90% tiene mayor efectividad sobre la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*.

Palabras Clave

Staphylococcus aureus, Concentración Mínima Inhibitoria, Concentración Mínima Bactericida, Halos de Inhibición, Actividad Antibacteriana.

SUMMARY

The aim of this research work was the evaluation of the antibacterial activity of the orange essential oil (*Citrus sinensis*) on the *Staphylococcus aureus* ATCC® 25904 strain. The research was carried out in the Faculty of Agricultural Sciences of the Technical University of Ambato. The orange essential oil (AEN) was obtained by the steam drag method. The evaluation concentration was 10%, 30%, 50%, 70%, 90% of the orange essential oil, diluted in peptone water and tween 80 as tensioactive agent. To determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the broth microdilution method was used, observing the results at 0, 2, 4, 6 and 24 hours after incubation at 37°C. The inhibition of the bacterial growth was observed between the concentration of 30% y 50%. The Minimum Bactericidal Concentration (CMB) was determined, which showed positive results at 24 hours, as there was no growth of *S. aureus* between 30% y 50% concentration. The sensitivity test showed inhibition results from concentrations of 50% when presenting inhibition zones of 11.16 mm; 11.26 mm and 14.84 mm respectively; it is concluded that the treatments at 50%, 70% and 90% are effective, being 50% and 70% statistically equal ($p = <0,05$). Therefore they shown a similar efficacy. While, the concentration at 90% is more effective on the bacterial strain *S. aureus*.

Keywords

Staphylococcus aureus, Minimum Inhibitory Concentration, Bactericidal Minimum Concentration, Inhibition Halos, Antibacterial Activity.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las enfermedades presentes en los animales de importancia zootécnica son las de origen microbiano (Guerra, Soto, Medina, Ojeda de R, & Peña, 2014), estos microorganismos patógenos están libres en el medio ambiente (Alekhun & Levy, 2007) al momento de ingresar en el huésped liberan endotoxinas en el interior de la célula afectando al mecanismo normal de la fagocitosis, (Fisher & Phillips, 2008) impidiendo de esta manera su destrucción, (Massey & Peacock, 2002) causando a la vez diferentes cuadros patológicos de acuerdo a su localización en el organismo animal. Una de las bacterias de gran importancia en medicina veterinaria el cual ha provocado pérdidas a nivel productivo y económico es el *Staphylococcus aureus* (Chaves, Timarán, Astaíza, Benavides, & Chaves, 2017), (Proctor, van Langevelde, Kristjansson, Maslow, & Arbeit, 1995) microorganismo gram positivo no esporulado conocido como un patógeno oportunista que produce una amplia variedad de enfermedades generalizadas como: osteomielitis, otitis, artritis, endocarditis, piómetra, abscesos, síndrome del shock tóxico, infecciones cutáneas, urinarias (Bustos, Hamdan, & Gutiérrez, 2006); a la vez e el agente causal específico de la mastitis bovina (Stanchi *et al.*, 2007), daños que se le atribuye a la resistencia que tienen al medio ambiente, a ciertos antibióticos y por la presencia de factores de virulencia como: proteína A, leucocidina, capsula y enzimas como la coagulasa (Rodríguez, 2011).

En la actualidad la preocupación por controlar las enfermedades bacterianas ha impulsado a encaminar una búsqueda de nuevos productos terapéuticos (Souza *et al.*, 2008); a la vez la necesidad de proteger al medio ambiente y mantenerlo intacto, nos enfoca al uso de productos orgánicos de desecho como la cáscara de los cítricos del cual se puede obtener el aceite esencial (Settanni *et al.*, 2014), el mismo que está conformado por metabolitos secundarios (Yanez, Lugo, & Parada, 2007), estos compuestos han atraído la atención a nivel industrial debido a su actividad antibacteriana, antifúngico, antioxidante, plaguicida y antiinflamatorio (Gerhardt, Wiest, Girolometto, & Magnólia, Silva da Silva Weschenfelder, 2012), se ha comprobado que la acción antimicrobiana en productos de cítricos como: el aceite de

limón, mandarina, toronja está relacionada a la cantidad de bioflavonoides que contienen, entre ellos el principal D- limoneno y el citral (Bustamante & Delgado, 2015), los mismos que actúan directamente en la célula microbiana provocando la descomposición en la membrana celular, pared celular, sistema enzimático, síntesis de proteínas afectando de esta manera su actividad e inhibiendo su crecimiento (Mercado, Llenque, & Trujillo, 2014).

Mediante este proyecto investigativo se pretende evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de naranja sobre *Staphylococcus aureus*, empleando a técnica microbiológica de difusión en disco y con la obtención de resultados crear una referencia para distintas aplicaciones del mismo en la Medicina Veterinaria.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

En la presente investigación se evaluaron diferentes concentraciones del aceite al 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% obtenidas de las cortezas de mandarina prensadas al frío; se aplicó en bacterias gram positivas y gram negativas, utilizando como comparativo el aceite comercial Gerch a través de la técnica de difusión en agar en placas, determinando actividad bactericida contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* al colocar 10 µl en cada pozo, presentando halos de inhibición de 4 mm y 5 mm de diámetro en concentraciones al 50%, 60%, 70%, 80% y con una media de 5 mm de diámetro en concentraciones al 90% y 100%. La CMI fue de 9% a 19% para *B. subtilis* y 7% - 17% para *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Estos resultados varían de acuerdo a la composición, método de extracción, la variedad, madurez del fruto, el almacenamiento y finalmente por el tipo de pared celular que posea la bacteria (Martínez *et al.*, 2003).

Churata *et al.* (2016) a través de su trabajo investigativo confirmó que el aceite esencial de *Citrus paradisi* “Toronja” actúa sobre cepas de *Candida albicans* las mismas que fueron aislados de pacientes con diagnóstico de estomatitis subprotésica; realizó la prueba de sensibilidad por el método de difusión en pozos, en donde depositó 50 µl del aceite esencial en 12 pocillos por placa, luego incubó en aerobiosis a 37 °C por 48 horas. Al proceder al análisis de los resultados, las concentraciones al 25%; 12,5%; 6,25%; 3,13% y 1,56% presentaron halos de inhibición promedio de 12,6 mm; 10,3 mm; 7,8 mm; 6,8 mm y 6,3 mm correspondientemente. La CMI promedio para *Candida albicans* fue de 6,25% con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de promedios entre las concentraciones.

El principal objetivo fue evaluar el efecto de la alta presión durante un tiempo determinado de 3 y 10 minutos a 300 y 500 MPa sobre cáscaras de cítricos, en cual se demostró que el nivel máximo de contenidos fenólicos totales (TPC), así como la capacidad antioxidante es mejor a 300 MPa durante los 3 minutos, a la vez se determinó su capacidad de eliminación de radicales libres de DPPH usando el ensayo de decoloración de cationes radicales de ABTS, se utilizó agua destilada como control negativo y se agregó 10 µl de los extractos acuosos a diferentes concentraciones (1 mg/ml; 0,6 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,15 mg/ml; 0,08 mg/ml; 0,04 mg/ml), presentando mayor actividad antimicrobiana en la cáscara de naranja en comparación con el limón, lima, mandarina para las cepas bacterianas *Acinetobacter* y *Listeria innocua*, con halos de inhibición desde 5,7 mm en la concentración al 0,15 mg/ml hasta 11,7 mm al manejar una concentración de 1 mg/ml (Casquete *et al.*, 2015).

En el siguiente estudio, las concentraciones utilizadas fue desde 10% hasta el 100% en 6 bacterias gram positivas y 8 gram negativas, inoculando 20 µl en pocillos de 6 mm de diámetro y 5 mm de profundidad realizados en el agar Mueller Hinton, luego se incubó por 24 horas a 37°C, observando resultados con mayor actividad antimicrobiana en el jugo y cáscara de *Citrus limon* con una zona de inhibición desde 10 – 30 mm en bacterias como *S. aureus* y *Enterococcus faecalis* de la misma manera las cáscaras de *Citrus limetta* marcaron zonas de inhibición de 10 - 35 mm, esto se debe al contenido de pH el cual afecta directamente en la capa de peptidoglucano de las gram positivas, interfiriendo en las cargas de los aminoácidos y finalmente alterando su actividad. En el análisis estadístico se encontró diferencias significativas entre los efectos de *Citrus limon* (seco) y *Citrus limon* (jugo) en un nivel ($P \leq 0.05$) (Kadhim & Ghani, 2013).

El presente estudio evaluó los extractos de las cáscaras y zumo de limón (*Citrus limón* v. Eureka) por sus contenidos fenólicos y actividades antimicrobianas *in vitro*, el intervalo de las concentraciones fue 0,5; 0,25; 0,0625; 0,0312; 0,0156; 0,0078; 0,0039; 0,0019 y 0,0010% diluido en metanol al 80%. Encontrando en el estudio fitoquímico la presencia de quercitina, ácido gálico en los dos extractos y la vainillina solo en el extracto de zumo, el contenido de flavonoides en la cáscara fue de (30,10 ± 2.98 mg de GAE/g) y (19,78 ± 0,10 mm de QE/g) y en el zumo (2,78 ± 0,06 mg de GAE/g) y (0,13 ± 0,001 mg de QE/g) al probar los dos extractos en bacterias patógenas y una cepa de hongos a través del método de difusión en disco, encontrando mayor susceptibilidad para *Staphylococcus epidermis* mostrando una zona de inhibición en el extracto de zumo de 32 mm y en el extracto de cáscara de 31 mm de la misma manera en la cepa de *S. aureus* la zona de inhibición del extracto de zumo fue de 12 mm y para el extracto de cáscara 22 mm (Halima & Allem, 2016).

Ramirez & Marín, (2012) evaluó dos tipos de métodos para demostrar la actividad antibacteriana de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas colombianas, sobre bacterias como *Staphylococcus aureus* ATCC (American type culture collection) 33591, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Pseudomona aureginosa* ATCC 27853 y unos aislamientos de *Salmonella gallinarum*, *Echericha coli* N° 1 resistente a amoxicilina y *Echericha coli* N° 2 sensible a amoxicilina, empleando concentraciones de 50 µg/µl, 30 µg/µl y 10 µg/µl solubilizado en DMSO (dimetilsulfóxido) en el primer método realizó 5 pozos de 6 mm de diámetro en el cual colocó 10 µg/µl, en el siguiente se empleó una cantidad de 20 µg/µl incubando a 37°C por 24 horas y 4 horas respectivamente, confirmando que los aceites esenciales tienen actividad antibacteriana *in vitro*, siendo de manera más confiable por el método de dilución debido a los compuestos bioactivos que actúan sobre las bacterianas, por otra parte los extractos etanólicos presentaron una reducida actividad sobre los microorganismos evaluados, inclinándose su preferencia por las bacterias gram positivas.

Aboelhadid et al. (2016) evaluó seis concentraciones 2,5%; 5%; 10%; 20%; 50% y 100% de aceite esencial de limón, diluidas con agua destilada; las pruebas *in vitro* se realizó en el laboratorio aplicando cinco repeticiones de la respectiva concentración en cada caja petri, con intervalos de tiempo de 1 h, 12h y 24 h, en donde muestra que el aceite esencial de limón al 10% y 20% causó una mortalidad del 100% de los ácaros al transcurrir 24 horas. En base a los resultados ya obtenidos se procedió aplicar las concentraciones al 20%, la deltametrina y el control directamente en los 24 conejos, los cuales se dividieron en grupos de ocho, las pruebas *in vivo* mostraron resultados favorables al aplicar el aceite esencial de limón con una notable reducción de los signos clínicos, a la vez un alto rendimiento productivo y un mayor crecimiento del pelaje a partir de la segunda semana.

El objetivo es evaluar la actividad del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis L.*) sobre los hongos en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) en un diseño completamente al azar, el aceite se extrajo de las cáscaras de las naranjas a través de la técnica de hidrodestilación a vapor asistida por microondas (HDMO), se utilizaron concentraciones de 0%; 1%; 2,5% y 5% del AEN en medio de cultivo de PDA, colocando un disco de 0,5 cm de diámetro del micelio de cada hongo en cada caja petri con 10 ml de PDA (pH 6,1). Los resultados *in vitro* mostraron un efecto inhibitor superior a un 80% en concentraciones a 2,5% y 5% del aceite esencial de naranja (AEN), en el estudio *in vivo* se aplicó 4 tratamientos y 3 repeticiones, se recubrió los frutos con las concentraciones anteriores y se observó una disminución de las lesiones, sin alguna diferencia significativa en el análisis estadístico ($p < 0.05$) en las dos pruebas (Guédez *et al.*, 2014).

Olivero et al. (2009) evaluó la actividad repelente de tres aceites esenciales (EO) y un comercial contra especies *Tribolium castaneum* *Herbst*, obtenidos por el método de hidrodestilación, la misma que se empleó a concentraciones de 0,00002 µl; 0,0002 µl; 0,002 µl; 0,02 µl y 0,2 µl disuelto en acetona, las mismas que se colocó en el papel de filtro, aplicando como control positivo un repelente comercial (Stay off), la cual contiene como ingrediente activo etilbutilacetilaminopropionato (IR3535) al 15%. Demostró que los aceites esenciales es capaz de repeler los insectos de acuerdo a la concentración y el tiempo de exposición, en concentraciones mínimas presento repelencia del 14% y 24% a mayores concentraciones logro repeler hasta un 94% y 96% al emplear el aceite esencial de *Cymbopogon nardu*, *Lippia organoides* y con el aceite esencial de *Citrus sinensis* un 18% y 78% respectivamente, al exponer a los microorganismos durante 2 horas, aunque luego de 4 horas el porcentaje de repelencia fue ligeramente mayor en comparación con el producto comercial IR3535.

Golmakani & Moayyedi, (2015) comparo los diferentes métodos de extracción asistida por microondas de aceites esenciales, la cual se basó en adquirir una cantidad necesaria de cáscara de limón para comprobar cual metodología de extracción permite conservar intactos los compuestos del aceite esencial, los cítricos se recolectaron de la plantación experimental ubicada en la región de Jahrom, se retiró el flavedo manualmente para dejarlo secar por tres días y luego almacenarlas en fundas de polietileno, antes de la extracción se midió la humedad tanto en las cáscaras secas y frescas. En los resultados del análisis de cromatografía de gases mostró que no hay variación en los compuestos del aceite a pesar de la metodología que se emplee en comparación con la hidrodestilación convencional, en lo que se refiere a la cantidad final del extracto es preferible el método de extracción por microondas lo que permite la correlación entre la masa y el calor.

Vílchez *et al.*, (2011) demostró en su trabajo investigativo la presencia de actividad antimicrobiana y antioxidante en 6 tipos de cáscaras: Tangelo (híbrido de *Citrus reticulata* con *Citrus paradise*), Mango (*Manguifera indica*), Naranja (*Citrus sinensis*), Guayaba (*Psidium guajava*), Pomelo (*Citrus grandis*) y Limón (*Citrus aurantifolia*) debido a la cantidad de polifenoles y a la capacidad que tienen como atrapadores de radicales libres, las mismas que se evaluaron a través del método de hemólisis inducida por AAPH y DPPH, en los resultados se observó que las cáscaras liofilizadas presento mayor capacidad antihemolítica comparada con el té verde, a la vez se comprobó que los extractos utilizados en varias bacterias inhiben su crecimiento, formando halos de 14±0,06 mm en *E. coli* con el uso de 35 mg de guayaba y halos de 13±0,5 mm en *S. aureus* con el extracto de mango a 700 µg.

Como puede observarse en el trabajo de Fancello *et al.*, (2016) a través del análisis de cromatografía de gases, permitió determinar la composición del aceite esencial de las hojas de limón, encontrando limoneno (256 mg/ml), geranial (214mg/ml) y neral (173 mg/ml), mediante los ensayos in vitro de DPPH y ABTS se valoró la capacidad antioxidante, con el método de microdilución en caldo se observó la actividad antibacteriana en 12 bacterias y 4 levaduras, los resultados mostraron una baja actividad inhibitoria frente cepas de *Lactobacillus*, mientras que *L. monocytogenes* y *S. aureus* se inhibieron a concentraciones mínimas del aceite esencial, en cuanto a las levaduras la más susceptible fue *Saccharomyces cerevisiae* presentando un retraso en su crecimiento.

Mercado *et al.*, (2014) A través de su trabajo investigativo establece que al aplicar concentraciones de 20%, 40%, 60%, 80% y 100% obtenidas por el método de destilación por arrastre de vapor de la cáscara (flavedo) de mandarina, en la misma que utilizo como control la Vancomicina y la Ciprofloxacina, determino que hay sensibilidad en *S. aureus* desde una concentración al 20% siendo mayor al 100% con halos de 21 mm y 22 mm superando a los resultados del tratamiento control, en cuanto a *P. aeruginosa* fue de 9 mm y 15 mm respectivamente, concluyendo que a mayor concentración del aceite esencial hay mayor sensibilidad de la bacteria.

Argote et al. (2017) mediante pruebas *in vitro* de los aceites esenciales de eucalipto, cáscara de limón y mandarina, preparados en forma de emulsiones a intervalos entre 2; 9,2 µl/ml y 2; 14,6 µl/ml, constatando su estabilidad termodinámica por 48 horas para observar cambios durante su almacenamiento, a la vez se realizó estudios de cromatografía de gases adjunto al de masas, en el cual encontró una semejanza de los compuestos entre los aceites como limoneno, terpineno, octanal y mirceno; en el eucalipto se destacó el eucaliptol (1,8 cineol) y pineno, la bioactividad de estos componentes varían de acuerdo al método de extracción, etapa del fruto y el lugar de la cosecha; con el método de microdilución se comprobó que el eucalipto y la mandarina actúan tanto en gram positivas y gram negativas, en cual la CMI y CMB en *S. aureus* fue de 6,8 µl/ml, en *E. coli* de 13,2 µl/ml en donde se demostró que las bacterias gram positivas son más sensibles a los aceites esenciales por su estructura celular, al presentar extremos lipofílicos que permiten la penetración del compuesto hidrófobo, que interactúan con las propiedades funcionales del mismo y causa su muerte.

En este trabajo se analizó el aceite esencial de las hojas y ramas frescas de naranjo (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck var *malesy*), extraído por hidrodestilación durante 5 horas, el rendimiento del aceite de las hojas fue 0,2% v/w mientras que en las ramas fue 0,1% v/w; los compuestos volátiles del aceite se detalló por cromatografía de gases adjunto al de masas, en el cual se encontró el sabineno (36,5%; 33,0%), terpinen-4-ol (8,2%; 6,2%), d-3-careno (7,0%; 9,4%), limoneno (6,8%; 18,7%), trans-ocimeno (6,7%; 6,1%) y b-mirceno (4,5%; 4,4%) de igual manera se comprobó por medio del análisis *in vitro* que el aceite de las hojas es más eficaz como agente antimicrobiano que el de las ramas frente a *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. typhimurium* y *A. fumigatus*, el mismo que se incrementa por la cantidad de compuestos oxigenados presentes en el aceite esencial (Eldahshan & Halim, 2016).

Mediante la investigación efectuada por Nwankwo, Onwuakor, & Aninweze, (2014) se analizó la actividad de los extractos etanólicos de cáscaras de *Citrus sinensis* maduras e inmaduras contra 3 bacterias gram negativas y dos gram positivas, mediante el método de difusión en pozos se demostró que las cáscaras maduras no influyen sobre las bacterias en estudio, a diferencia de los extractos de las cáscaras inmaduras que presenta una mayor inhibición en *P. aeruginosa* con halos de 7,00 mm a 16,63mm y *S. aureus* con halos de 7,00 mm a 15,00 mm, la actividad antibacteriana se le atribuye al contenido de flavonoides, alcaloides, glucósido cianogénico, taninos, saponinas, fenoles y al pH verificado en el análisis fitoquímico, los mismos que actúan sinérgicamente inhibiendo la síntesis de proteínas celulares y el crecimiento de los patógenos. Las concentraciones empleadas fueron 25 mg/ml; 50 mg/ml; 100 mg/ml; 150 mg/ml y 200 mg/ml, con una CMI y CMB para *S. aureus* de 25 mg/ml y 50 mg/ml respectivamente.

Mehmood *et al.*, (2015) En su indagación por conocer la acción y composición de la cáscara madura de *Citrus sinensis* contra bacterias patógenas tanto gram positivas y gram negativas, utilizó el método de difusión en Agar para las pruebas *in vitro* en el cual se colocó los discos impregnados con la sustancia extraída, con los diferentes disolventes empleados se demostró que el etanol tiene mayor efectividad seguida por el metanol, cloroformo y éter, con halos de inhibición de $12,6 \pm 0,94$ mm y $11,6 \pm 1,2$ mm para *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente, a diferencia de los extractos con metanol que actúan específicamente en *S. odorífera* las que presenta una zona de inhibición de $10,0 \pm 2,16$ mm, lo que demuestra que los compuestos se conservan de acuerdo al solvente, los mismos que actúan como antibacterianos, en el análisis fitoquímico se demuestra que las saponinas y taninos solo están presentes en solventes polares.

El estudio realizado por Olabanji, Ajayi, Akinkunmi, Kilanko, & Adefemi, (2016) evaluó el aceite esencial de la cáscara y semilla de *Citrus sinensis*, las mismas que se extrajo manualmente, secando por medio de una estufa y al medio ambiente respectivamente, para luego ser molidas, como solvente se utilizó el n-hexano y así obtener el aceite esencial, al ser empleada en las bacterias y hongos se comprobó una alta capacidad de inhibición en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* a una concentración de 2,5 mg/ml con halos de inhibición de 6 mm y 2 mm por parte del aceite esencial de semilla y a 40 mg/ml la zona de inhibición fue de 14 mm y 10 mm, en cuanto a la zona de inhibición por parte de la cáscara fue de 8 mm y 7 mm respectivamente. En el análisis fisicoquímico se encontró que hay mayor presencia de ácidos grasos libres en la cáscara de naranja como el ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmitoleico que actúan como antioxidante la misma que se encuentran en menor proporción en la semilla, estos ácidos grasos actúan junto con otras propiedades fisicoquímicas para combatir de manera más eficaz a los microorganismos patógenos.

Adu et al. (2016) recolectó la fruta de diversas localidades y etapas de desarrollo desde 3, 6, 10, 12 meses y frutos caídos, para la respectiva evaluación se empleó el método de difusión en pozos o Kirby Bauer en bacterias gram positivas, gram negativas y hongos, en los resultados se comprobó que las concentraciones de jugo a 12, 5%; 25%; 50%; 100% las mismas que actuaron positivamente frente a las bacterias en la que se observó un incremento de la zona de inhibición de crecimiento en *S. aureus* de 10,33 mm; 13,83 mm; 18,33 mm y 25,33mm respectivamente en las etapas tempranas del fruto, ya que a medida que madura se pierde la acidez e incrementa el pH, a la vez disminuye los metabolitos secundarios entre ellos los flavonoides, quercitina los responsables de la actividad antioxidante y antibacteriana, con una CMI que va desde 8,00% a 20,00%; 16,00% a 28,00%; 24,00% a 32,00% ; 28,00% a 40,00% y 32,00% a 44,00 respectivamente.

Nata et al., (2018) evaluó extractos acuosos y etanólicos de los tallos secos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Naranja) y *Citrus aurantifolia* (Cristm.) Swingle (Cal), los mismos que se molieron y tamizaron para colocar en el solvente respectivo (agua destilada; etanol) las concentraciones que se utilizó fue 500 mg/ml; 375 mg/ml; 250 mg/ml y 125 mg/ml, con el método de difusión en pozo se comprobó la actividad antibacteriana con 0,2 ml de cada concentración, al transcurso de las 24 horas se observó la inhibición en el crecimiento de *S. aureus* el cual presentó halos desde 7 mm a 10 mm en extractos etanólicos de los tallos del naranjo y lima, con una CMI y CMB de 25 mg/ml y 100 mg/ml en el extracto etanólico de naranjo. Los resultados de los análisis fitoquímico de los tallos demostraron que hay una cantidad apreciable de alcaloides, flavonoides, esteroides, antraquinonas e hidratos de carbono.

2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL

2.2.1. Cítricos (*Citrus spp.*)

- Antecedentes

Los cítricos se originaron hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático, en la zona que abarca desde la vertiente meridional del Himalaya hasta China meridional, Indochina, Tailandia, Malasia e Indonesia (Sintes Pros, 1985). Actualmente su cultivo se extiende por la mayor parte de la regiones tropicales y subtropicales. Dividida en varias especies e híbridos, entre ellos tenemos los más conocidos a nivel de comercialización como la naranja, limón, lima, mandarina (Stampella, Hilgert, & Pochettino, 2018). Entre ellos países productores de naranja tenemos a Estados Unidos, Brasil, España, México, Italia, Japón, Argentina, Unión Sudafricana, Israel, Argelia, Chile, Marruecos, India, Uruguay (Durán Ramírez, 2009). Los cítricos se cultivan por sus frutos, los cuales son de agradable sabor que se consumen como fruta fresca, en forma de zumo (concentrado, fresco, pasteurizado, etc.), mermeladas y jaleas, en nuestro medio el consumo se da únicamente como fruta fresca y en un porcentaje muy bajo en mermeladas, licores y frutas confitadas (Londoño, Sierra, Álvarez, Restrepo, & Pássaro, 2015).

TABLA 1. Taxonomía de la Naranja (*Citrus sinensis*)

Reino	Vegetal
Orden	Geraniales
Familia	Rutácea
Genero	<i>Citrus</i>
Especie	<i>C. sinensis</i>

Fuente: Martínez *et al.*, 2003

- Naranja (*Citrus sinensis*)

Fruto cilíndrico u ovalado de color anaranjado de 110 a 200 gr de peso, puede o no presentar semillas con una germinación satisfactoria. El árbol mide 4 a 6 m de altura, su tallo es recto o bifurcado, hojas abundantes y perennes de color verde oscuro, brillante por el haz y mate por el envés, flores blancas hermafroditas (Sintes Pros, 1981).

Las variedades son extensas pero se las divide en dos grupos importantes: la dulce o de consumo (*Citrus sinensis*) y la agria o amarga (*Citrus aurantium*) entre ellas tenemos las conocidas como Sevilla de la cual se toma las cortezas y la pulpa para preparar mermeladas y extraer aceites (Njoroge, Koaze, Karanja, & Sawamura, 2005). A la vez se hace una subdivisión del primer grupo de sabor dulce en las siguientes variedades: las de maduración temprana la Washington navel y Bahianina; intermedias como la criolla y las tardías como la Valencia, populares por su abundancia en jugo y una delgada cáscara (Hours *et al.*, 2005). El proceso de maduración de la fruta respecto a la producción de azúcares, disminución de acidez y el desarrollo del color, alcanzan su mayor eficiencia cuando existe mayor variación de la temperatura (Rodríguez & Garzón, 2012). La temperatura óptima para el cultivo de los cítricos son las comprendidas entre 13°C y 30°C. La planta puede morir a - 9°C y - 10°C. Los cítricos en regiones donde la humedad relativa es alta tienden a tener piel más delgada y suave, contienen mayor cantidad de jugo (Nuñez *et al.*, 2015). Los requerimientos de suelo para un buen desarrollo del cultivo de los cítricos son: terrenos fértiles, permeable (arcillo – arenosos), bien expuesto con una profundidad no inferior a 120 cm, bien drenados ya que los cítricos no toleran el encharcamiento. El agua debe estar a más de 150 cm de profundidad, el pH recomendado es de 5.5 a 7, medianamente tolerante a la salinidad y poco tolerante a la acidez (Durán Ramírez, 2009).

- **Composición y Valor Nutritivo**

Las naranjas aparte de ser agradables al gusto, también se las reconoce por sus valores nutritivos y medicinales a nivel industrial. Los principales componentes de los cítricos son: ácido cítrico, ácido málico, azúcares, pectina, aceite esencial (limoneno, pineno, citral), alcoholes (Yovo *et al.*, 2016), vitaminas (vitamina A, B1, B2) y la más esencial la vitamina C por su propiedad antiescorbútica, sales minerales (calcio, hierro, fósforo y potasio), oligoelementos (Londoño *et al.*, 2015). La corteza es de espesor desigual y que encierran numerosas glándulas que excretan una esencia de olor penetrante (Sintes Pros, 1985). En las primeras etapas encontramos un color verde debido a la clorofila, que luego de su destrucción cambia a verde pálido y amarillo, por la presencia de xantofilas y carotenos (provitamina A), el cambio se debe a una reacción fotoquímica en la que es indispensable la presencia de la luz (Durán Ramírez, 2009).

En la fruta madura hay un incremento de dextrosa, levulosa y sacarosa, con una disminución del ácido cítrico (Sintes Pros, 1981). Esta fruta además contiene unos pigmentos amarillos llamados flavonoides que tienen propiedades antiinflamatorias, antibacteriales e inhibidoras de enzimas y antioxidantes (Moreno, Belen, Sanchez, Vilorio, & García, 2004). El término flavonoides denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo- γ -pirano, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares en forma de glicósidos (Cartaya & Reynaldo, 2001).

Las flavonas y flavonoles, son compuestos que existen en muy pequeñas cantidades comparados con los otros flavonoides. Son incoloros o solo ligeramente amarillos, los glicósidos más conocidos son la hesperidina y naringina de la corteza de los frutos cítricos (Damián, González, & Chávez, 2016). Las funciones de los flavonoides en las plantas se pueden resumir en tres grupos: papel de defensa, papel de señal química y efecto sobre las enzimas (Manuel, González, Ramirez, Esquivel, & Camacho, 2016). Entre los flavonoides de mayor relevancia como fitoalexinas se encuentran los isoflavonoides de muchas leguminosas, aunque también se deben mencionar la coumarinas de los cítricos y los ácidos fenólicos de la papa, lechuga y manzana (Narayana, Reddy, Chaluvadi, & Krishna, 2001).

Destilación por arrastre de vapor (DAV)

Cuando se utiliza vapor saturado o sobrecalentado, producido fuera del equipo principal (caldera, autoclave de presión o un recipiente adecuado) el proceso se denomina destilación por arrastre de vapor, es una técnica usada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla (Jiang, Yang, Zhu, Piao, & Jiang, 2011), como resinas o sales inorgánicas u otros compuestos orgánicos no arrastrables (Torres *et al.*, 2016). La destilación por arrastre de vapor también se emplea con frecuencia para separar aceites esenciales de tejidos vegetales. Los aceites esenciales son mezclas complejas de hidrocarburos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonílicos, aldehídos aromáticos y fenoles que se encuentran en las diferentes partes de la planta como: hojas, tallos, cáscaras o semillas (Qiao *et al.*, 2008).

2.2.2. *Staphylococcus aureus*

Bacterias grampositivas comensales de la piel, las mucosas, en especial digestivas y rinofaringe, se lo encuentra a la vez en procesos supurativos, es el microorganismo más extendido que existe. Son células esféricas, con un diámetro de 0,5 – 1,5 μm . mediante la tinción estas se encuentran aisladas, en pares o formando pequeñas cadenas. Si proviene de un cultivo en agar nutritivo, los cocos se agrupan en forma de racimos de uvas. No forman esporas, no tienen flagelos, pueden ser aerobios o anaerobios facultativos. Fermentan carbohidratos y producen pigmentos de color blanco, amarillo o dorado y algunas cepas presentan una capa de polisacáridos extracelulares tanto *in vitro* como *in vivo* (Stanchi *et al.*, 2007).

TABLA 2. Taxonomía de *Staphylococcus aureus*.

Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacili
Orden	Bacillales
Familia	Staphylococcaceae
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>S. aureus</i>

Fuente: Cervantes, García, & Salazar, 2014

- **Características fisiológicas y estructurales de los estafilococos**

La capsula está constituida por polisacáridos unidos a la pared celular, hay 11 serotipos identificados en *S. aureus*, sirve de protección de la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares, también permite que se unan a materiales sintéticos (Cervantes *et al.*, 2014). El peptidoglucano de la pared celular estimula la producción de interleuquina-1 (actúa como pirógeno endógeno), de anticuerpos opsónicos en los monocitos, la agregación de los leucocitos polimorfonucleares, posee actividad parecida a las endotoxinas y activa al complemento. La superficie externa contiene una proteína denominada factor de agregación o coagulasa de unión, esta proteína se une al fibrinógeno por una reacción no enzimática y lo convierte en fibrina insoluble, provocando que se agreguen y formen grupos (Bustos *et al.*, 2006).

Una característica que tienen en común los gram positivos es que soportan la desecación y viven en medios líquidos a -30°C y 60°C , con variación en el pH entre 4 y 9, concentraciones de sal del 7, 5%, son inhibidos por la acción bacteriostática de los colorantes trifenil- metano, también son sensibles a las penicilinas y B- lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, lincosamidas y macrólidos. Si presenta resistencia a oxacilina se denomina meticilinorresistencia (MR), si existe esta MR esta puede verse acompañada por resistencia frente a gentamicina, eritromicina, cloranfenicol y tetraciclinas (Stanchi *et al.*, 2007).

- **Modo de Infección y Enfermedades**

Staphylococcus aureus provoca infecciones tanto endógenas como exógenas, por inhalación, contacto directo o ingestión. Produce una gran variedad de proteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades, puede acceder al tejido provocando lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis. Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales. Provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas y produce el síndrome del shock tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo. Además, causa septicemia, impétigo y fiebres. Ya que la cepa se encuentra continuamente en la piel, está expuesta a todas las terapias con antibióticos surgiendo de esta manera los microorganismos resistentes (Stanchi *et al.*, 2007).

2.2.3. **Pruebas *in vitro***

- **Medios de cultivo**

Se encuentra desecados, luego al prepararse de acuerdo el medio de cultivo puede ser sólido, semisólido o líquido, la que contiene nutrientes indispensables, condiciones favorables de pH y temperatura para el crecimiento de microorganismos (Stanchi *et al.*, 2007).

- **Caldo cerebro-corazón:** resulta ser efectiva en el cultivo y mantenimiento de una amplia variedad de microorganismos, los estafilococos que crecen en esta infusión suelen dar mejores reacciones en la prueba de la coagulasa (Diaz, Rodriguez, & Zhurbenko, 2013).

- **Agar Sal Manitol:** permite el crecimiento de un determinado grupo de bacterias mientras que inhibe el crecimiento de bacterias gram negativas. Este medio es importante ya que es capaz de distinguir los microorganismos patogénicos en un corto periodo de tiempo. Contiene una alta concentración (- 7,5% -10%) de sal (NaCl), haciéndolo selectivo para *Staphylococcus* debido a que el nivel de NaCl es inhibitorio para la mayoría de las bacterias, por medio de la fermentación manitol genera un cambio de color de rojo pálido a amarillo (Cervantes *et al.*, 2014).
- **Agar Mueller Hinton:** es medio universal de cultivo nutritivo no selectivo, no diferencial que promueve el desarrollo microbiano, es utilizado en forma rutinaria en la prueba de sensibilidad a antibióticos en medio sólido, debido a que presenta buena reproductibilidad lote a lote, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente (Bannoehr, Franco, Iurescia, Battisti, & Fitzgerald, 2009).
- **Métodos de Evaluación de Sensibilidad Bacteriana**

Existen dos métodos los cuantitativos y cualitativos, los primeros determinan la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB), mientras el otro método permite calcular la sensibilidad bacteriana a través de difusión en disco (Ramirez & Marin, 2009).

- **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La CMI es la Concentración Mínima Inhibitoria que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo. Los agentes antimicrobianos diluidos conjuntamente con una cantidad estandarizada del organismo puro aislado, se incuban de 18 – 24 horas y se dejan en observación hasta que se desarrolle el crecimiento de las bacterias. La cantidad mínima de antimicrobiano necesaria para inhibir el crecimiento nos da CMI (Owuama, 2017).

- **Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

Concentración Mínima Bactericida (CMB) se define como la menor concentración de antibiótico capaz de provocar, no solo la suspensión del crecimiento, sino la destrucción de la bacteria en un 99.9% (Owuama, 2017).

- **Disco de Difusión**

El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorio; presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles. Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de los Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Wayne, 2015) .

CAPITULO III

3.1. HIPÓTESIS

El aceite esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) posee actividad antibacteriana sobre la cepa de *Staphylococcus aureus*.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) sobre la cepa *Staphylococcus aureus*.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) sobre la cepa *Staphylococcus aureus*.

Determinar el efecto bactericida del aceite esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) sobre la cepa *Staphylococcus aureus* mediante la medición de los halos de inhibición en placa.

CAPITULO IV MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato ubicada en el sector de Querochaca, perteneciente al Cantón Cevallos, provincia de Tungurahua a una distancia de 20 km al del Cantón Ambato, con una altitud de 2 865 msnm, cuyas coordenadas geográficas son: 01°22'0,2'' de latitud Sur y 78° 36' 22'' de longitud Oeste (sistema de posicionamiento global, GPS).

4.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

La investigación se realizó en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de ciencias agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Técnica de Ambato ubicada en el sector de Querochaca, provincia de Tungurahua. Las condiciones meteorológicas se resumen en la Tabla 3.

TABLA 3. Información del Lugar del Experimento.

DATOS	INFORMACIÓN
Precipitación, mm/año	200-500
Temperatura, °C	16-18
Humedad relativa, %	69

Fuente: INAMHI, 2018

4.3. EQUIPOS Y MATERIALES

4.3.1. Material Químico

- Aceite Esencial de Naranja

4.3.2. Material Biológico

- Cepa certificada *Staphylococcus aureus* ATCC® 25904

4.3.3. Reactivos

- Caldo cerebro- corazón
- Medio de cultivo (Agar Sal Manitol y Müller Hinton)
- Emulsionante (Tween 80)
- Agua destilada
- Agua peptonada

4.3.4. Equipos y Material de Laboratorio

- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Incubadora
- Cocineta eléctrica
- Balanza analítica/ electrónica
- Refrigeradora
- Agitador magnético
- Pipetas de 10 ml y 25 ml
- Matraz Erlenmeyer
- Vasos de precipitación
- Soporte universal
- Pinzas
- Refrigerante- Condensador
- Mandil
- Guantes
- Cajas Petri de 90 mm
- Tubos de ensayo
- Probetas
- Gotero
- Lámparas de alcohol
- Espátula
- Asa de platino
- Cepillo de lavar equipos de vidrio
- Gradilla
- Gasas

- Algodón
- Papel aluminio
- Papel empaque
- Fósforos
- Discos en blanco de sensibilidad bacteriana marca OXOID

4.4. FACTORES EN ESTUDIO

4.4.1. Concentraciones

Se emplearon 5 concentraciones de aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) y se adicionó como control (agua peptonada y tween).

10%	(D1)
30%	(D2)
50%	(D3)
70%	(D4)
90%	(D5)

4.4.2. Cepa bacteriana

- Cepa certificada de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25904

4.5. TRATAMIENTOS

En la tabla 4, para la presente investigación, existe 5 tratamientos cada uno con las concentraciones de aceite esencial de naranja al 10%,30%,50%,70%, 90% además se manejó como control el agua peptonada y tween 80; se realizó un total de 20 repeticiones por tratamiento, distribuido en 5 cajas Petri con 4 discos impregnados con la concentración correspondiente.

TABLA 4. Esquema de los tratamientos.

Símbolo	Descripción	Cajas Petri / Tratamiento	Discos de Sensibilidad / Caja Petri	Repeticiones / Tratamiento
D1	10% de Aceite Esencial de Naranja.	5	4	20
D2	30% de Aceite Esencial de Naranja.	5	4	20
D3	50% de Aceite Esencial de Naranja.	5	4	20
D4	70% de Aceite Esencial de Naranja.	5	4	20
D5	90% de Aceite Esencial de Naranja.	5	4	20
Total				100

4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la presente investigación se aplicó el diseño completamente al azar (DCA) con 20 repeticiones, el respectivo análisis de varianza y la prueba de TUKEY al 5% para comparar los tratamientos.

4.7. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.7.1. Obtención del material biológico

La cepa certificada *Staphylococcus aureus* ATCC® 25904 se adquirió en el laboratorio MEDIBAC.

4.7.2. Obtención del Aceite Esencial de Naranja

Las naranjas empleadas para el trabajo de investigación fueron obtenidas en Ambato en el mercado Mayorista, luego de lavarlas con agua corriente, se procedió a quitar la cáscara, cortándola en trozos de 2 cm de ancho, hasta obtener la cantidad de un quintal, la obtención del aceite se realizó a través del método de destilación por arrastre de vapor, la materia prima se introdujo en un destilador de doble fondo con capacidad de 80 kg, en el cual se colocó una cierta cantidad de agua y el material vegetal (cáscara de naranja), al final sellamos herméticamente, para evitar fugas de vapor y temperatura, al llegar a los niveles de vaporización, las células vegetales se rompieron e iniciaron a liberar los componentes volátiles (aceite), estas se canalizaron por una tubería en espiral, la que se encuentra dentro de un tubo de intercambio térmico, que permite la condensación y separación del agua y el aceite. La extracción duro aproximadamente 8 horas. El producto final (aceite esencial de naranja) se almaceno en refrigeración en un frasco color ámbar, hasta el momento de su uso, luego se tomó del 100%, 5 ml para la preparación de cada una de las concentraciones, indicadas en la tabla 5.

TABLA 5. Preparación de las concentraciones del Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*).

Reactivos y sustancia química (ml)	Concentraciones (%)				
	10 %	30%	50%	70%	90%
Agua peptonada	4.5 ml	3.5 ml	2.5 ml	1.5 ml	0.5 ml
Aceite Esencial de Naranja	0.5 ml	1.5 ml	2.5 ml	3.5 ml	4.5 ml
Tween 80	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml

4.7.3. Elaboración de los medios de cultivo

Se tomó en cuenta las indicaciones de etiquetado en el envase por medio de la casa comercial, suspendiendo en agua destilada el volumen requerido para dicha investigación, la misma que se calculó aplicando una regla de tres, al mezclarla completamente se la llevo a esterilizar a la autoclave a 121°C por 15 min. El agar Sal Manitol se utilizó como medio diferencial para la activación y el crecimiento del *S. aureus*, por medio del caldo cerebro – corazón se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria y para la Concentración Mínima Bactericida, se utilizó el agar Mueller Hinton. En cuanto a la evaluación de la sensibilidad antibacteriana de la cepa certificada de *S. aureus* la realizamos en el agar Mueller Hinton como medio específico, empleando los discos oxoid de sensibilidad impregnada con las diferentes concentraciones del Aceite Esencial de Naranja 10%, 30%, 50%, 70%, 90% y como control agua peptonada y tween 80.

4.7.4. Activación de la cepa

Para este procedimiento se tomó la parte superior del hisopo en donde se encuentra una ampolleta con fluido de hidratación, la misma que comprimimos con la yema de los dedos, para que de esta manera el contenido se libere y llegue a la parte inferior del hisopo, y se active la cepa de *S. aureus*, luego se continuó con la siembra respectiva en el Agar Sal Manitol a través de la técnica de estriación por el método escoses, se incubo a 37°C por 24 horas, en forma invertida, con la respectiva rotulación de la caja petri.

4.8. VARIABLE RESPUESTA

4.8.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se lo realizo por el método de microdilución en caldo, en donde se tomó en una asa bacteriológica 5 colonias aisladas de la misma morfología del medio cultivado y se lo inoculo en el caldo cerebro-corazón y se incubó por 3 horas a 37°C, hasta obtener una turbidez estandarizada al tubo # 0,5 de la escala de McFarland, obteniendo el estándar establecido de $1,5 \times 10^8$ de unidades formadoras de colonias.

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria se tomó del National Committee for Clinical Laboratory Standards (Wayne, 2015), tomando a partir del inoculo estandarizado y distribuída de la siguiente manera:

En el tubo N°1 se colocaron 1 ml del inoculo más 1 ml del Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) al 10%.

En el tubo N°2 se colocaron 1 ml del inoculo más 1 ml del Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) al 30%.

En el tubo N°3 se colocaron 1 ml del inoculo más 1 ml del Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) al 50%.

En el tubo N°4 se colocaron 1 ml del inoculo más 1 ml del Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) al 70%.

En el tubo N°5 se colocaron 1 ml del inoculo más 1 ml del Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) al 90%.

Los tubos inoculados se incubo a una temperatura de 37°C por 24 horas y posterior a este tiempo, se observó la turbidez.

4.8.2. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Para establecer la CMB, se tomó una muestra de los de la CMI con las distintas concentraciones, los cuales se replicaron en las placas petri con agar Mueller Hinton y se incubo a 37°C por 24 horas, posterior a este procedimiento se observó el crecimiento de las colonias de *S. aureus*.

4.8.3. Método de Difusión en Disco y Medición de los Halos de Inhibición

Mediante el uso de un hisopo estéril se tomó el inóculo estandarizado con el tubo # 0,5 de la escala de McFarland, ejerciendo presión contra las paredes del tubo se retiró el exceso de líquido, realizamos la siembra del inóculo en la caja petri con agar Mueller Hinton, por medio de la técnica de estriación por agotamiento, en forma paralela y bien compacta, el proceso se lo repitió rotando la placa 60° en dos oportunidades, dejando secar 10 minutos antes de colocar los discos. Los discos se tomaron con una pinza anatómica estéril para colocarlos sobre el agar Mueller Hinton, para su adherencia al agar presionamos el disco ligeramente, ubicando 4 discos en cada caja petri de 90 mm por cada una de las concentraciones al 10%, 30%, 50%, 70%, 90% del aceite esencial de naranja, a unos 15 mm del borde de la misma. Luego se incubó a 37°C en grupos no mayores a diez placas durante 24 horas en forma invertida. Finalmente se realizó la lectura de los halos de inhibición con una regleta (mm).

4.9. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

El análisis estadístico, se realizó utilizando el programa INFOSTAT versión 2015.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. RESULTADOS

5.1.1. Concentración Mínima Inhibitoria

TABLA 6. Concentración Mínima Inhibitoria del Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*).

Cepa Bacteriana	Tiempo	Diluciones del Aceite de Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)					Control negativo	
		10%	30%	50%	70%	90%	Agua peptonada	Tween
		Crecimiento						
	<i>0 horas</i>	+	+	+	+	+	+	+
	<i>2 horas</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	<i>4 horas</i>	+	+	+	+	+	+	+
	<i>6 horas</i>	+	+	+	+	+	+	+
	<i>24horas</i>	+	+	-	-	-	+	+

S. aureus= *Staphylococcus aureus*. Positivo (+), Negativo (-).

La Concentración Mínima Inhibitoria en la cepa *S. aureus*, se realizó mediante la siembra en placa para una mejor observación del crecimiento bacteriano, referido en la Tabla 6. Observando entre las concentraciones al 30% y 50% del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) una visible inhibición parcial del crecimiento bacteriano desde su incubación, correspondiente a la CMI.

5.1.2. Concentración Mínima Bactericida

TABLA 7. Concentración Mínima Bactericida del Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*).

Cepa Bacteriana	Tiempo	Diluciones del Aceite de Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)					Control negativo	
		10%	30%	50%	70%	90%	Agua peptonada	Tween
Crecimiento								
<i>S. aureus</i>	24horas	+	+	-	-	-	+	+

S. aureus = *Staphylococcus aureus*. Positivo (+), Negativo (-).

En la Tabla 7, no se observa crecimiento de colonias de la cepa *S. aureus*, entre las concentraciones al 30% y 50%, resultado positivo a partir de las 24 horas de incubación, lo que corresponde a la Concentración Mínima Bactericida (CMB), tomado en cuenta como la eliminación del 99,9% de las bacterias.

5.1.3. Halos de Inhibición

TABLA 8 . Halos de sensibilidad (mm) del Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*).

TRATAMIENTO						
Concentración	50%	70%	90%	E.E	CV	Valor de P.
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,16 ^b	11,26 ^b	14,84 ^a	0,8457	14,81	<0,0001

abc = Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

E.E = Error Estándar. C.V = Coeficiente de variación

En la Tabla 8, el Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) mostró una actividad antibacteriana sobre la cepa *S. aureus*, en los tratamientos al 50%, 70% y 90% con un diámetro de inhibición de 11,16 mm; 11,26 mm; 14,84 mm respectivamente, siendo las tres concentraciones efectivas frente a la bacteria, siendo la mejor al 90%, ya que las concentraciones al 50% y 70% no son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

5.2. DISCUSIÓN

En la presente investigación al emplear el aceite esencial de Naranja se demostró que tiene efecto antibacteriano para la cepa *S. aureus*; corroborando con lo mencionado por Ramirez & Marín, (2012) que al extraer el aceite esencial de diferentes plantas a través del método de destilación presento mayor actividad contra las bacterias, Golmakani & Moayyedi, (2015) menciona que dependiendo del solvente se conservara compuestos como: las saponinas y taninos (Mehmood et al., 2015), los cuales se pierden al emplear solventes no polares (L. Ramirez & Marín, 2012). Estos fenoles son compuestos bioactivos hidrófobos (Halima & Allem, 2016) que alteran la permeabilidad y permiten atravesar la membrana celular bacteriana, afectando en su metabolismo e interfiriendo en la generación de ATP y finalmente causando su muerte (Kadhim & Ghani, 2013).

Al evaluar el aceite esencial de naranja mostró resultados significativos, observando que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) sobre la cepa *S. aureus*, está entre las concentraciones al 30% y 50% ; resultados que se comparan con la investigación de Martínez et al., (2003) con el Aceite esencial de Mandarina, estableciendo una CMI para *S. aureus* al 17%; así como por Adu *et al.*, (2016) cuyas concentraciones mínimas inhibitorias fueron de 8% y 20%, en el cual se logró observar que los rangos de las concentraciones mínimas inhibitorias son similares en todos los cítricos. A la vez en la presente investigación se observó la inhibición del crecimiento de la cepa *S. aureus* en un 99,9%, en concentraciones a partir del 50% correspondiente a la Concentración Mínima Bactericida (CMB); mientras que Nata et al., (2018) señala una CMB a partir de 50 mg/ml al utilizar extracto etanólico del tallo de *Citrus sinensis*, resultado que se asemejan a los indicados por Nwankwo *et al.*, (2014) al emplear extractos etanólicos de las cáscaras de frutos maduros e inmaduros de *Citrus sinensis*, sin embargo Vélchez *et al.*, (2011) no evidencio ninguna inhibición de crecimiento por parte del extracto acuoso de la cáscara de naranja. De acuerdo con Olivero *et al.*, (2009) los resultados varían dependiendo del tiempo de exposición, el mismo que es fundamental para tener un amplio espectro de acción sobre el microorganismo; Olabanji *et al.*, (2016) menciona que la variedad, su estado fisiológico y su procesamiento, si influye en las características físicas y químicas del Aceite Esencial de Naranja.

La actividad antimicrobiana del Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*), demuestra que tiene un efecto partir de las concentraciones al 50% ante la cepa *S. aureus* con halos de 11,16 mm; 11,26 mm y 14,84 mm; asemejándose a los resultados obtenidos por Adu *et al.*, (2016) en el cual mostro halos de inhibición de 10,33 mm; 13,83 mm; 18,33 mm; 25,33 mm al utilizar jugo de Naranja, siendo este valor muy similar al encontrado por Kadhim & Ghani, (2013) en donde los diámetros de los halos fueron de 10 mm – 30 mm para *S. aureus* con el uso de extractos de cáscara de limón, idéntico a la investigación de Halima & Allem, (2016) la misma que mostro una zona de inhibición de 31mm - 32 mm, por otra parte observo halos con diámetros de 21 mm y 22 mm al emplear concentraciones altas de Aceite Esencial de Mandarina sobre *S. aureus*, resultados que difieren con los observados por Martínez *et al.*, (2003) en donde los halos presentaron diámetros de 4 mm y 5 mm a partir de la concentración al 50%; Olivero *et al.*,(2009); Fancello *et al.*, (2016) indican que a medida que incrementa la concentración del aceite esencial, mayor es la zona de inhibición del crecimiento bacteriano; por otro lado Mehmood *et al.*, (2015) menciona que además depende de la solubilidad, el medio de cultivo (agar) y la velocidad de difusión.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA, ANEXOS

6.1. CONCLUSIONES

- La concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida del Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) se encuentran entre las concentraciones al 30% y 50%, es necesario realizar ensayos adicionales para estimar de manera más exacta el valor de la CMI y CMB.
- Se determinó que el Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) tiene actividad antibacteriana significativa en *Staphylococcus aureus* a las concentraciones de 50%, 70% y 90%. Concluyendo que las tres concentraciones tienen efecto sobre la bacteria, siendo el mejor al 90%, ya que las dos concentraciones anteriores comparten significancia.

6.2. BIBLIOGRAFÍA

Aboelhadid, S. M., Mahrous, L. N., Hashem, S. A., Abdel, E. M., & Miller, R. J. (2016). In vitro and in vivo effect of Citrus limon essential oil against sarcoptic mange in rabbits. *Parasitology Research*, 115(8), 3013–3020.

<https://doi.org/10.1007/s00436-016-5056-8>

- Adu, F., Apenteng, J., Kuntworbe, N., Gariba, W., Appiah, T., & Ntinaagyei, D. (2016). Antimicrobial and antioxidant activities of *Citrus sinensis* var . late Valencia fruits at various stages of development. *African Journal of Microbiology*, *10*(3), 74–78. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015>
- Alekshun, M., & Levy, S. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, *128*(6), 1037–1050. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
- Argote, F., Suarez, Z., Tobar, M., Perez, J., Hurtado, A., & Degado, J. (2017). Evaluation of the inability capacity of essential oils in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Bioteconología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, *15*(2), 52–60. Retrieved from <http://revistabioteconologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/bioteconologia/article/view/593/435>
- Bannoehr, J., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A., & Fitzgerald, J. R. (2009). Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*(2), 469–471. <https://doi.org/10.1128/JCM.01915-08>
- Bustamante, O. del P., & Delgado, E. (2015). Efecto inhibitorio del jugo y desecado de jugo de Limón *Citrus aurantifolia* en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Revista Tzhoecoen*, *7*(1), 179–194.
- Bustos, J., Hamdan, A., & Gutiérrez, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed*, *17*(4), 287–305. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2006/bio064f.pdf>
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, *22*(2), 5–14. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193215009001.pdf>
- Casquete, R., Castro, S. M., Martín, A., Ruiz, S., Saraiva, J. A., Córdoba, M. G., & Teixeira, P. (2015). Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of citrus peels. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *31*, 37–44.

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.07.005>

- Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana Patología Clínica Medica de Laboratorio*, 61(1), 28–40. Retrieved from www.medigraphic.com/patologiaclinica
- Chaves, C., Timarán, D., Astaíza, J. M., Benavides, C., & Chaves, F. (2017). Hallazgos histopatológicos en la glándula mamaria de bovinos diagnosticados con mastitis clínica en la planta de beneficio del municipio de Ipiales, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (33), 43–50. <https://doi.org/10.19052/mv.4050>
- Churata, D., Ramos, D., Moromi, H., Martínez, E., Castro, A., & Garcia De La Guarda, R. (2016). Efecto antifungico de citrus paradisi “toronja” sobre cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con estomatitis subprotésica. *Revista Estomatol Herediana.*, 26(2), 78–84. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/reh/v26n2/a04v26n2.pdf>
- Damián, A., González, J., & Chávez, M. D. C. (2016). Procedimientos actuales para la extracción y purificación de flavonoides cítricos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 135–147. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57724>
- Diaz, M., Rodriguez, C., & Zhurbenko, R. (2013). Enterococcus , medios de cultivo convencionales y cromatogénicos. *Revista Cubana de Higiene Y Epidemiología.*, 51(1), 97–110. Retrieved from <http://scielo.sld.cu>
- Durán Ramírez, F. (2009). *Manual de citricos : especies, variedades, cultivos, injertos*. (Granja integral, Ed.) (1 ed). Bogotá - Colombia: Grupo Latino Editores.
- Eldahshan, O. A., & Halim, A. F. (2016). Comparison of the Composition and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Green Branches and Leaves of Egyptian Navel Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. malesy). *Chemistry and Biodiversity*, 13, 681–685. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500139>
- Fancello, F., Petretto, G. L., Zara, S., Sanna, M. L., Addis, R., Maldini, M., ... Pintore,

- G. (2016). Chemical characterization, antioxidant capacity and antimicrobial activity against food related microorganisms of Citrus limon var. pompia leaf essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 579–585. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.018>
- Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*, 19(3), 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.11.006>
- Gerhardt, C., Wiest, J. M., Girolometto, G. S., & Magnólia, Silva da Silva Weschenfelder, S. (2012). Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15, 11–17. <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012005000033>
- Golmakani, M.-T., & Moayyedi, M. (2015). Comparison of heat and mass transfer of different microwave-assisted extraction methods of essential oil from Citrus limon (Lisbon variety) peel. *Food Science & Nutrition*, 3(6), 506–518. <https://doi.org/10.1002/fsn3.240>
- Guédez, C., Cañizalez, L., Avendaño, L., Scorza, J., Castillo, C., Olivar, R., ... Sánchez, L. (2014). Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 34(2), 81–87. Retrieved from [/scielo.php?script=sci_arttext&pid=&lang=pt](http://scielo.php?script=sci_arttext&pid=&lang=pt)
- Guerra, L., Soto, Z., Medina, G., Ojeda de R, G., & Peña, J. (2014). Actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus sinensis*) var. Valencia frente a microorganismos gram positivos y gram negativos. *Revista de La Facultad de Agronomía de La Universidad Del Zulia (LUZ)*., 31, 215–232.
- Halima, S., & Allem, R. (2016). Evaluation of antimicrobial activity of Algerian Lemon (*Citrus limon* v. Eureka) peels and juice extracts. *Der Pharmacia Lettre*, 8(19), 197–204. Retrieved from <http://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/evaluation-of-antimicrobial-activity-of-algerian-lemon-citrus-limon-v-eureka-peels-and-juice-extracts.pdf>
- Hours, R., Ferreyra, M., Schvad, M., Gerard, L., Zapata, L., & Davies, C. (2005).

Caracterización fisicoquímica y microbiológica de jugos de naranja destinados a vinificación. *Ciencia, Docencia Y Tecnología*, 16(31), 219–239. Retrieved from http://www.researchgate.net/publication/26482046_Caracterizacin_fisicoquimica_y_microbiologica_de_jugos_de_naranja_destinados_a_vinificacin/file/60b7d523b69e91b014.pdf

INAMHI. (2018). INAMHI - PRONÓSTICO. Retrieved March 29, 2018, from <http://186.42.174.241/InamhiPronostico/>

Jiang, M. H., Yang, L., Zhu, L., Piao, J. H., & Jiang, J. G. (2011). Comparative GC/MS Analysis of Essential Oils Extracted by 3 Methods from the Bud of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Journal of Food Science*, 76(9), 1219–1225. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02421.x>

Kadhim, N. K., & Ghani, Z. A. (2013). Antimicrobial Activity of Different Aqueous Lemon Extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(6), 74–78. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3611>

Londoño, J., Sierra, J., Álvarez, R., Restrepo, A., & Pássaro, C. (2015). Aprovechamiento de los subproductos cítricos. In *Cítricos: Cultivo, Poscosecha e Industrialización* (Vol. 12, pp. 343–367). Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/267802091>

Manuel, J., González, O., Ramirez, M., Esquivel, P., & Camacho, M. del R. (2016). Chemistry and Pharmacology of *Citrus sinensis*. *Molecules*, 21(247), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules21020247>

Martínez, J., Sulbarán, B., Ojeda, G., Ferrer, A., & Nava, R. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Revista de La Facultad de Agronomía de La Universidad Del Zulia (LUZ)*, 20(4), 502–512.

Massey, R. C., & Peacock, S. J. (2002, October 15). Antibiotic-resistant subpopulations of the pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* confer population-wide resistance. *Current Biology*, 12(20), 686–687. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01205-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01205-8)

- Mehmood, B., Khurshid, D., Ali, S., Awan, U., Nayyer, A., Ghous, T., & Andleeb, S. (2015). In vitro assessment of antioxidant, antibacterial and phytochemical analysis of peel of *Citrus sinensis*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1), 231–239. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/257932280>
- Mercado, P., Llenque, L., & Trujillo, M. (2014). Sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a concentración de aceite de *Citrus reticulata* variedad Satsuma “ mandarina .” *Ciencia Y Tecnología*, 10(2), 61–71. Retrieved from <http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/570>
- Moreno, M., Belen, D., Sanchez, M., Vilorio, M., & García, D. (2004). Evaluacion de la actividad antioxidante de extracto de flavonoides de cáscara de naranja en el aceite de soya desodorizado. *Revista Científica de America Latina Y El Caribe, España Y Portugal.*, 29(9), 532–538. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/339/33909611.pdf>
- Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R., & Krishna, D. R. (2001). Bioflavonoids Classification , Pharmacological , Biochemical Effects and Therapeutic Potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33, 2–16.
- Nata, M., Dalhat, M., Omoye, B., Isah, A., Kabiru, S., Bashiru, I., & Umar, A. (2018). Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck [Orange] and *Citrus aurantifolia* (Cristm.) Swingle [Lime] Stem from Bacteria Associated with Dental Caries. *Journal of Advances in Microbiology*, 8(4), 1–9. <https://doi.org/10.9734/JAMB/2018/39134>
- Njoroge, S. M., Koaze, H., Karanja, P. N., & Sawamura, M. (2005). Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet oranges (*Citrus sinensis*). *Flavour and Fragrance Journal*, 20(1), 80–85. <https://doi.org/10.1002/ffj.1377>
- Nuñez, K., Castellano, G., Ramirez, R., Sindoni, M., Hidalgo, P., & Marin, C. (2015). Efecto del estado de madurez sobre las características fisicoquímicas del limón criollo (*Citrus aurantifolia* Chris). *GEOMINAS*, 43(67), 103–108.
- Nwankwo, I., Onwuakor, C., & Aninweze, O. (2014). Antibacterial activity of Ethanolic extracts of *Citrus sinensis* peels on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia*

coli and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Wound infections. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, 3(4), 941–947. Retrieved from https://www.academia.edu/9669180/Antibacterial_activity_of_Ethanollic_extracts_of_Citrus_sinensis_peels_on_Staphylococcus_aureus_Escherichia_coli_and_Pseudomonas_aeruginosa_isolated_from_Wound_infections?auto=download

Olabanji, O., Ajayi, S., Akinkunmi, E., Kilanko, O., & Adefemi, G. (2016). Physicochemical and in vitro antimicrobial activity of the oils and soap of the seed and peel of *Citrus sinensis* Physicochemical and in vitro antimicrobial activity of the oils and soap of the seed and peel of *Citrus sinensis*. *African Journal of Microbiology*, 10(8), 245–253. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7797>

Olivero, J., Caballero, K., Jaramillo, B., & Elena, E. (2009). Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia organoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas en Colombia frente a *Tribolium castaneum*, Herbst. *Revista de La Universidad Industrial de Santander*, 41(3), 244–250.

Owuama, C. (2017). Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. *African Journal of Microbiology Research*, 11(23), 977–980. <https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8545>

Proctor, R. A., van Langevelde, P., Kristjansson, M., Maslow, J. N., & Arbeit, R. D. (1995). Persistent and Relapsing Infections Associated with Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 20(1), 95–102. <https://doi.org/10.1093/clinids/20.1.95>

Qiao, Y., Bi, J. X., Zhang, Y., Zhang, Y., Fan, G., Xiao, L. Y., & Si, Y. P. (2008). Characterization of aroma active compounds in fruit juice and peel oil of Jincheng sweet orange fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O. *Molecules*, 13(6), 1333–1344. <https://doi.org/10.3390/molecules13061333>

Ramirez, L., & Marín, D. (2012). Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites

esenciales y extractos etanólicos utilizando métodos de difusión en agar y dilución en pozo. *Scientia et Technica*, 17(50), 152–157. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84923878022>

Ramirez, S., & Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, XV(42), 263–268. Retrieved from [http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/685/Metodologias para evaluar.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/685/Metodologias_para_evaluar.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Rodríguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153–170. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>

Rodriguez, J., & Garzón, D. (2012). Alternancia de la producción y comportamiento fenológico de la naranja “Valencia” (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) en el trópico bajo húmedo de Colombia. *Corpoica Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 136–144. <https://doi.org/10.21930/rcta.vol13>

Settanni, L., Randazzo, W., Palazzolo, E., Moschetti, M., Aleo, A., Guarrasi, V., ... Germanà, M. a. (2014). Seasonal variations of antimicrobial activity and chemical composition of essential oils extracted from three *Citrus limon* L. Burm. cultivars. *Natural Products Research - Parts A & B*, 28(6), 383–391. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.871544>

Sintes Pros, J. (1981). *Virtudes Curativas de la Naranja, la Mandarina y el Pomelo*. (Les Fonts de Terrassa, Ed.) (2 ed). Barcelona: SINTES, S.A.

Sintes Pros, J. (1985). *Virtudes Curativas del limón*. (Les Fonts de Terrassa, Ed.) (3 ed). Barcelona: SINTES, S. A.

Souza, L., Frascolla, R., Santin, R., Ziemann dos Santos, M. A., Costa Schram, R., Alves, M. R., ... Araújo, M. C. (2008). Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13(4). Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-

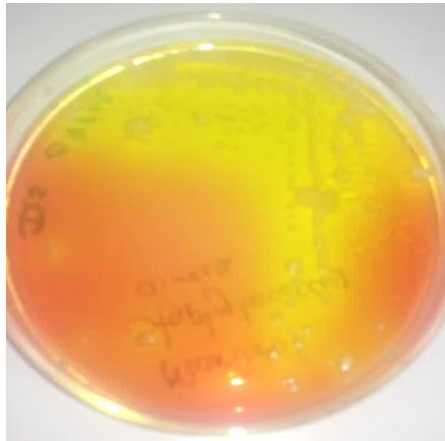
- Stampella, P., Hilgert, N., & Pochettino, L. (2018). Usos medicinales de los cítricos (Citrus L., Rutaceae) entre los criollos del sur de Misiones (Argentina). *GAIA SCIENTIA*, 12(1), 90–108.
- Stanchi, N. O., Martino, P., Gentilini, E., Reinoso, H., Echeverria, G., Leardini, N., & Copes, J. (2007). *Microbiología veterinaria* (1 ed). Buenos Aires, Republica de Argentina: Inter-Medica. <https://doi.org/978-950-555-321-1>
- Torres, C., Núñez, A., Rodríguez, J., Castillo, S., Leos, C., & Báez, J. G. (2016). Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils. *CyTA - Journal of Food*, 1–7. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1220021>
- Vílchez, J., García, R., Vivar, J., Solari, S., Kusch, F., & Arredondo, M. (2011). Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de Pica. *Biofarbo*, 19(1), 1–7.
- Wayne, P. (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fifth Informational Supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 35(3), 1–231. Retrieved from <http://shopping.netsuite.com/s.nl/c.1253739/it.A/id.1684/f>
- Yanez, X., Lugo, L. L., & Parada, D. Y. (2007). Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (Citrus sinensis, variedad Valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander, Colombia). *Bistua: Revista de La Facultad de Ciencias Básicas*, 5(1), 3–8. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90350101>
- Yovo, M., Alitonou, G. A., Sessou, P., Dedome, L., Tchobo, F., Avléssi, F., ... Sohounhloué, D. (2016). Phytochemistry and antibacterial activity of Citrus sinensis extracts against three pathogenic bacteria in Benin. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(6), 1344–1352.

6.3. ANEXOS

ANEXO 1. Obtención del Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) con el Método de Destilación por Arrastre de Vapor.



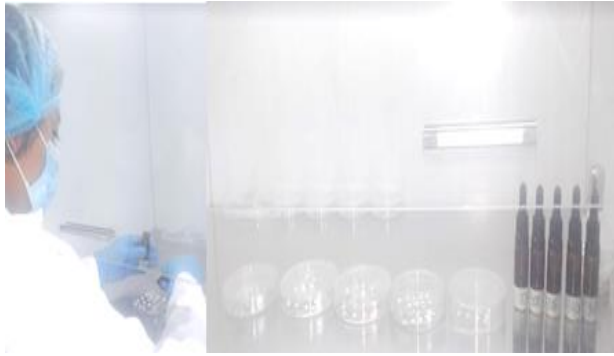
ANEXO 2. Siembra de *Staphylococcus aureus* en Agar Sal Manitol mediante estriación.



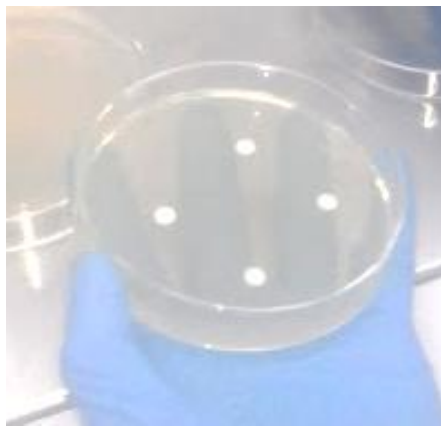
ANEXO 3. Concentración del Aceite Esencial de Naranja al 10%, 30%, 50%, 70% y 90%.



ANEXO 4. Impregnación de los Discos Oxoid con las diferentes concentraciones de Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*).



ANEXO 5. Distribución de los Discos de Sensibilidad a distintas concentraciones del Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) sobre el Agar Mueller Hinton.



ANEXO 6. Incubación de placas durante 24 horas.



ANEXO 7. Formación de Halos de Sensibilidad al 50%, 70%, 90%.



ANEXO 8. Diámetro de los Halos de inhibición (mm) de *Staphylococcus aureus*.

TRATAMIENTO	AGARES					
	I	II	III	IV	V	
B1D1		0	0	0	0	0
B1D2		0	0	0	0	0
B1D3		11,25	11	10,50	12	11,50
B1D4		12	11	10,5	12	10,25
B1D5		14,75	13,5	18,25	13,25	14,25

ANEXO 9. Análisis de Varianza de los halos de sensibilidad del Aceite Esencial de Naranja (*Citrus sinensis*) en *Staphylococcus aureus*.

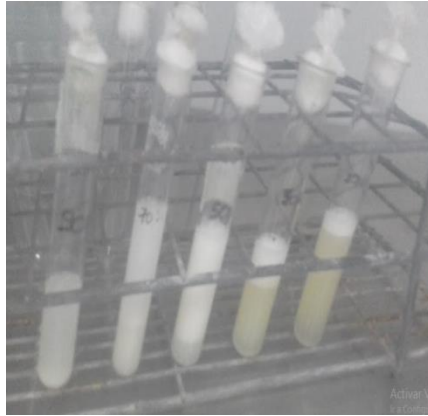
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1200,87	5	240,17	284,01	<0,0001
TRATAMIENTO	1200,87	5	240,17	284,01	<0,0001
Error	20,30	24	0,85		
Total	1221,1	29			

ANEXO 10. Prueba Tukey al 5% de los halos de sensibilidad (mm).

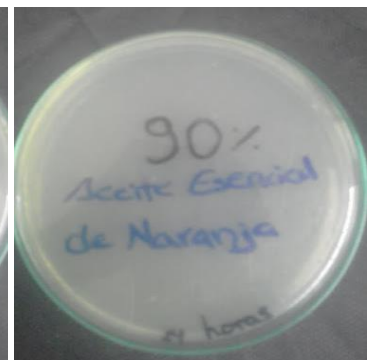
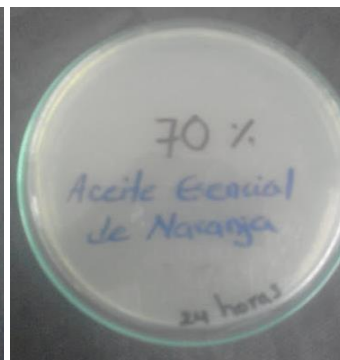
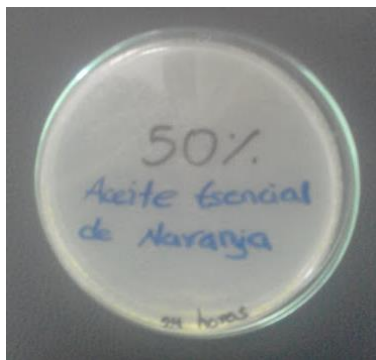
TRATAMIENTO	Medias	N	E.E	
D5	14,84	5	0,41	A
D3	11,26	5	0,41	B
D4	11,16	5	0,41	B
D1	0,00	5	0,41	C
D2	0,00	5	0,41	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,5$)

ANEXO 11. Concentración Mínima Inhibitoria al 50%, 70%, 90% a las 2 horas.



ANEXO 12. Concentración Mínima Bactericida al 50%, 70%, 90% a las 24 horas.



CAPITULO VII

PROPUESTA

Empleo del Aceite Esencial de Naranja al 90% como infusión intramamaria para tratar la mastitis causada por *Staphylococcus aureus*

7.1. DATOS INFORMATIVOS

Las instituciones involucradas en la presente propuesta será la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ganaderos de la provincia de Tungurahua.

7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria provocada por diversos factores entre ellos: bacterias (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*), traumas, irritaciones, etc. La vía principal de entrada de microorganismos es la glándula mamaria (orificio del pezón), la misma que estará determinada por la profundidad, longitud y morfología. Por la cual se implementa tratamiento directo al cuarto afectado en el periodo seco de los bovinos.

Mediante la presente investigación se corrobora que el método implementado para la obtención del Aceite Esencial de Naranja, no influyen en los compuestos secundarios que actúan como antibacteriano; por lo cual se podría implementarlas según la factibilidad, el Aceite Esencial de Naranja, demostró su eficacia en concentraciones al 50%, 70%, 90% con halos de 11,16 mm; 11, 26 mm y 14,84 mm respectivamente, teniendo en cuenta los siguientes resultados se puede implementar como control de *Staphylococcus aureus* agente etiológico de la mastitis bovina.

7.3. JUSTIFICACIÓN

El empleo del Aceite Esencial de Naranja a una concentración desde un 90% como infusión intramamaria permitirá reducir porcentualmente la presente bacteria *Staphylococcus aureus* que generalmente se encuentra en la glándula mamaria provocando inflamación de la misma, conjuntamente con el correcto control de la higiene durante el ordeño, la aplicación del Aceite Esencial de Naranja directamente en la glándula mamaria lograra reducir los daños colaterales producidos, y que el agente etiológico se disemine a través de la leche.

7.4. OBJETIVOS

Disminuir los problemas de mastitis producido por la contaminación de *Staphylococcus aureus*, aplicando Aceite Esencial de Naranja.

7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

El material biológico (cáscara de naranja) para el siguiente estudio está a libre disposición, al ser un producto orgánico de desecho luego de la extracción del jugo, para la obtención del Aceite Esencial de Naranja se puede implementar diferentes metodologías, las cuales mantienen intactas los compuestos secundarios del mismo que dan su valor antimicrobiano entre otros.

7.6. FUNDAMENTACIÓN

La mastitis bovina, es una inflamación de la glándula mamaria por un incorrecto manejo de las medidas de higiene durante el ordeño, siendo una de las principales causas que provocan la proliferación del *Staphylococcus aureus*, al usar el aceite esencial de naranja a partir del 90% como infusión intramamaria directamente en el cuarto afectado, se lograría disminuir la carga bacteriana y finalmente evitar la infección.

7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO

Al disponer del material biológico (Cáscara de naranja), se procederá a obtener el aceite esencial de naranja por el método de destilación por arrastre de vapor, al ser este proceso más fácil y conocido, mediante la decantación separaremos el agua restante y así obtener el aceite esencial puro, en la formulación del antimastítico manejaremos el diluyente respectivo para obtener la concentración deseada y aplicarlo directamente sobre la glándula mamaria infectada.

Mediante los resultados obtenidos, se dará a conocer a los ganaderos los beneficios antibacterianos del empleo del aceite esencial de naranja. Para tratar problemas de mastitis.

7.8. ADMINISTRACIÓN

La Universidad Técnica de Ambato por medio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera Medicina Veterinaria y Zootecnia, Ganaderos y estudiantes serán los responsables de cumplir con lo propuesto, dando a conocer la efectividad bactericida y metodología de empleo del Aceite Esencial de Naranja para tratar la mastitis.

7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

La propuesta permitirá a los ganaderos evitar pérdidas productivas y económicas por la diseminación de *Staphylococcus aureus*, se tomara en cuenta el tiempo de exposición y la cantidad necesaria de aceite esencial de naranja para la finalidad deseada.