

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL JUGO DE LIMÓN PERSA (*CITRUS LATIFOLIA TANAKÁ*), CRIOLLO (*CITRUS AURANTIFOLIA SWINGLE*), REAL (*CITRUS LIMÓN BURM*), LIMA (*CITRUS LIMETA RISSO*) Y JUGO DE LIMÓN COMERCIALIZADO (*RABINAL®*) CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO RESISTENTE Y *STREPTOCOCCUS B-HEMOLÍTICO* DEL GRUPO “A” ATCC 19615”

Estudio experimental realizado en el Centro de Investigaciones Biomédicas
de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos
de Guatemala
octubre-noviembre 2017

Tesis

Presentada a la Honorable Junta Directiva
de la Facultad de Ciencias Médicas de la
Universidad de San Carlos de Guatemala

**Shirley Guadalupe Sánchez Mejía
Dina Rosamérica Vásquez Florián
Alicia del Rocío Pacheco Salguero**

Médico y Cirujano

Guatemala, mayo de 2018

El infrascrito Decano y el Coordinador de la COTRAG de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, hacen constar que:

Las estudiantes:

- | | | | |
|----|-----------------------------------|-----------|---------------|
| 1. | Shirley Guadalupe Sánchez Mejía | 200910653 | 1955047040601 |
| 2. | Dina Rosamérica Vásquez Florián | 200940354 | 2226383702212 |
| 3. | Alicia del Rocío Pacheco Salguero | 200942689 | 1908265250503 |

Cumplieron con los requisitos solicitados por esta Facultad, previo a optar al Título de Médico y Cirujano en el grado de Licenciatura y habiendo presentado el trabajo de graduación titulado:

"ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL JUGO DE LIMÓN PERSA (*CITRUS LATIFOLIA TANAKÁ*), CRIOLLO (*CITRUS AURANTIFOLIA SWINGLE*), REAL (*CITRUS LIMÓN BURM*), LIMA (*CITRUS LIMETA RISSO*) Y JUGO DE LIMÓN COMERCIALIZADO (RABINAL®) CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO RESISTENTE Y *STREPTOCOCCUS β-HEMOLÍTICO* DEL GRUPO "A" ATCC 19615"

Estudio experimental realizado en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala
octubre - noviembre 2017

ORDEN DE IMPRESIÓN

En la Ciudad de Guatemala, el nueve de mayo del dos mil dieciocho


DR. MARIO HERRERA CASTELLANOS
DECANO



César O. García G.
Doctor en Salud Pública
Colegiado 5,950


DR. C. CÉSAR OSWALDO GARCÍA GARCÍA
COORDINADOR



El infrascrito Coordinador de la COTRAG de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, HACE CONSTAR que las estudiantes:

- | | | | |
|----|-----------------------------------|-----------|---------------|
| 1. | Shirley Guadalupe Sánchez Mejía | 200910653 | 1955047040601 |
| 2. | Dina Rosamérica Vásquez Florián | 200940354 | 2226383702212 |
| 3. | Alicia del Rocío Pacheco Salguero | 200942689 | 1908265250503 |

Presentaron el trabajo de graduación titulado:

"ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL JUGO DE LIMÓN PERSA (*CITRUS LATIFOLIA TANAKÁ*), CRIOLLO (*CITRUS AURANTIFOLIA SWINGLE*), REAL (*CITRUS LIMÓN BURM*), LIMA (*CITRUS LIMETA RISSO*) Y JUGO DE LIMÓN COMERCIALIZADO (RABINAL®) CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO RESISTENTE Y *STREPTOCOCCUS β-HEMOLÍTICO* DEL GRUPO "A" ATCC 19615"

Estudio experimental realizado en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala
octubre – noviembre 2017

El cual ha sido revisado por la Dra. Aída Guadalupe Barrera Pérez, y al establecer que cumplen con los requisitos establecidos por esta Coordinación, se les **AUTORIZA** continuar con los trámites correspondientes para someterse al Examen General Público. Dado en la Ciudad de Guatemala, a los nueve días de mayo del año dos mil dieciocho.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

César O. García G.
Doctor en Salud Pública
Colegiado 5,950

Dr. C. César Oswaldo García García
Coordinador



Guatemala, 9 de mayo del 2018

Doctor
César Oswaldo García García
Coordinador de la COTRAG
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente

Dr. García:

Le informamos que nosotras:

1. Shirley Guadalupe Sánchez Mejía
2. Dina Rosamérica Vásquez Florián
3. Alicia del Rocío Pacheco Salguero



Presentamos el trabajo de graduación titulado:

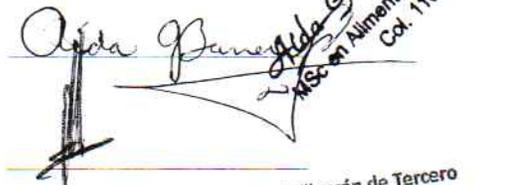
"ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL JUGO DE LIMÓN PERSA (*CITRUS LATIFOLIA TANAKÁ*), CRIOLLO (*CITRUS AURANTIFOLIA SWINGLE*), REAL (*CITRUS LIMÓN BURM*), LIMA (*CITRUS LIMETA RISSO*) Y JUGO DE LIMÓN COMERCIALIZADO (RABINAL®) CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO RESISTENTE Y *STREPTOCOCCUS β-HEMOLÍTICO* DEL GRUPO "A" ATCC 19615"

Estudio experimental realizado en el Centro de Investigaciones Biomédicas
de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos
de Guatemala
octubre – noviembre 2017

Del cual la asesora y revisora se responsabilizan de la metodología, confiabilidad y validez de los datos, así como de los resultados obtenidos y de la pertinencia de las conclusiones y recomendaciones propuestas.

Revisora: Dra. Aída Guadalupe Barrera Pérez
Reg. de personal No. 20030843

Asesora: Dra. Carmen Irene Villagrán de Tercero



Aída Guadalupe Barrera Pérez
MSc en Alimentación y Nutrición
Col. 11598

Dra. Carmen Villagrán de Tercero
Médico y Cirujano
Col. 3177

ACTO QUE DEDICO:

A DIOS: fuente de vida, amor, humildad y sabiduría, por estar presente siempre en mi vida, por darme fortaleza y protección en todo momento y ayudarme a superar obstáculos.

A MIS PADRES: por creer siempre en mí, especialmente a mi madre por su perseverancia, amor, paciencia, apoyo incondicional y sus palabras de ánimo y aliento en los momentos difíciles. Gracias por hacer de mí una persona de bien y por dedicarme los mejores años de su vida. Este triunfo es de ustedes.

A MIS HERMANOS Y MIS SOBRINAS: por su apoyo moral, cariño y comprensión.

A MIS AMIGOS Y AMIGAS: que estuvieron al lado mío durante el transcurso de los años y de la carrera, por su cariño, apoyo y todos los momentos de alegría compartidos.

A TODAS LAS PERSONAS: que fueron ángeles en mi camino y me tendieron la mano cuando lo necesite y contribuyeron a que este sueño se hiciera realidad.

A LOS DOCTORES: Aida Barrera, Analiss Perdomo, Carmen Villagran de Tercero, Paul Chinchilla, Sully Cruz y Rosa Elena Solis por su apoyo incondicional y aporte para que esta investigación se llevara a cabo.

A LA UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA: por abrirme las puertas para mi formación académica en la Facultad de Ciencias Médicas.

SHIRLEY GUADALUPE SÁNCHEZ MEJÍA

ACTO QUE DEDICO:

A DIOS: Ser supremo que nos colma con vida y sabiduría, por permitirme llegar hasta aquí y estar presente a cada instante, ser instrumento suyo para llevar a muchos salud, para él toda la gloria siempre.

A MIS PADRES: Dina Judith Florián Asencio y Mario Ronaldo Vásquez González, por ser mi apoyo incondicional, porque cuando creía no poder más, ser esa fuerza que me ayudó a continuar, especialmente a ti mami, por tus sacrificios y consejos, este triunfo es para ustedes.

A MIS ABUELOS: Juan Florián Corado, Rosa Margarita Asencio Ortega, Zoila América González (+), por ser mis segundos padres y acompañarme en este proceso con sus sabios consejos y su amor.

A MI HERMANO: Mario Ronaldo Vásquez Florián, por ser mi amigo y por ese amor incondicional, gracias.

A MI ESPOSO: Jeppser Adalberto Payes Rios, por su amor, apoyo, por la paciencia, consejos y ser ese motor que me empuja a querer siempre ser mejor, gracias, te amo.

A MIS TÍOS: Francisco, Antonia, Flor, Alejandra, Jorge Luis, Esther, Adan y Walter, por ser unos segundos padres para mí, eternamente agradecida.

A MIS PRIMOS: Maria Eugenia, Elisa, Celeste, Sandra, Claudia, Juan, Rocio, Francisco, Linda, Rosa, Moises, por ser mis segundos hermanos y alegrar mí día a día.

A MIS AMIGOS: especialmente, Linda Hernández, Astrid Hernández, Julieta Velasquez, Dra. Miriam Cogoux, a mis amigos de Chiquimula, que nuestra amistad dure por siempre.

A LAS DRAS: Aida Barrera, Analiss Perdomo, Carmen de Tercero, Sully Cruz, por su apoyo incondicional, paciencia y aporte para que esta investigación, gracias infinitas.

A MIS CATEDRÁTICOS: especialmente a la Dra. Rosa Elena Solis, por compartir su conocimiento, por sus sabias palabras y ayudarme a ser una buena profesional, eternamente agradecida.

A LA GLORIOSA TRICENTENARIA UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA: por darme la oportunidad de formarme y por acogerme en tan prestigiosa casa de estudios.

DINA ROSAMÉRICA VÁSQUEZ FLORIÁN.

ACTO QUE DEDICO:

A DIOS: por darme sabiduría, por mantenerme con fe y darme la fuerza cuando el camino se tornaba difícil, pero sobre todo por mostrarme que para Él no hay nada imposible.

A MIS PADRES: Obdulio Pacheco y Mayra Salguero, por su apoyo incondicional, su gran amor y por haber creído en mí aunque parecía imposible.

A MIS HERMANOS: Cynthia y Hader por estar conmigo en los momentos complicados de la carrera universitaria y no dejarme renunciar.

A MI ABUELITA: Alicia por mostrarme sus mejores deseos. Y las oraciones elevadas al Creador.

A MI FAMILIA: en especial a mis tías Claudia, Silvia y Maurita por hacerme sentir su cariño.

A MI NOVIO: José Alejandro Herrador por ser paciente y haberme motivado a ser valiente siempre.

A MI LIDER ESPIRITUAL: María Ángela de la Cruz por orar sin cesar y enseñarme a confiar en Dios.

A MIS AMIGOS: por llenar de alegría y buenos momentos mi vida.

ALICIA DEL ROCÍO PACHECO SALGUERO

AGRADECIMIENTOS

A nuestros revisores

Dra. Aida Guadalupe Barrera Pérez

Dr. Cesar Oswaldo García García

A nuestra asesora

Dra. Carmen Irene Villagrán Blanco

A nuestras co-asesoras

Dra. Ana Lis Perdomo Mendizábal

Dra. Sully Margot Cruz Velásquez

Universidad San Carlos de Guatemala

Facultad de Ciencias Médicas

Centro de Investigaciones Biomédicas

Colaboradores

Dr. Paul Chinchilla

Dr. Kevin Martínez

Licda Jaqueline Alvarado

Marcia Pérez

Brenda Cancinos

Sué Quan

De la responsabilidad del trabajo de graduación:

El autor o autores es o son los únicos responsables de la originalidad, validez científica, de los conceptos y de las opiniones expresadas en el contenido del trabajo de graduación. Su aprobación en manera alguna implica responsabilidad para la Coordinación de Trabajos de Graduación, la Facultad de Ciencias Médicas y para la Universidad de San Carlos de Guatemala. Si se llegara a determinar y comprobar que se incurrió en el delito de plagio u otro tipo de fraude, el trabajo de graduación será anulado y el autor o autores deberá o deberán someterse a las medidas legales y disciplinarias correspondientes, tanto de la Facultad, de la Universidad y otras instancias competentes.

RESUMEN

OBJETIVO: Determinar la eficacia antibacteriana *in vitro* del jugo de limón criollo (*Citrus aurantifolia Swingle*), persa (*Citrus latifolia Tanaká*) real (*Citrus limón Burm*), lima (*Citrus limetta Risso*) y jugo de limón comercializado (Rabinal®) contra *Staphylococcus aureus meticilino resistente* (aislado clínico) y *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615* de octubre a noviembre del 2017. **POBLACIÓN Y MÉTODOS:** Estudio experimental realizado en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas, USAC, mediante el método de Bauer Kirby con impregnación de discos de papel filtro y adaptación del método a gota directa en medio de cultivo Müller Hinton agar utilizando jugo de cítricos a concentraciones de 25, 50, 75 y 100%. **RESULTADOS:** Cuatro variedades de jugo de limón con la técnica 1 presentaron efecto inhibitorio *in vitro* contra *Streptococcus β-hemolítico del grupo A*, a partir de la concentración al 75% y con la técnica 2 se logró a partir del 50%. El jugo de limón real mostró el mayor halo de inhibición. Los cítricos estudiados no son eficaces para la inhibición *in vitro* de *Streptococcus β-hemolítico del grupo A* y *Staphylococcus aureus meticilino resistente*, para dicha conjetura se aplicó la prueba de Wilcoxon, y se obtuvo un valor p de 0.8. **CONCLUSIONES:** Todas las variedades de jugo de limón estudiadas presentan efecto inhibitorio *in vitro* contra *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615*, pero ninguna de ellas supera la eficacia antibacteriana *in vitro* del control positivo de azitromicina.

PALABRAS CLAVE: Bacterias, eficacia, inhibición, in vitro, jugo de limón.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO DE REFERENCIA	3
2.1.	Marco de antecedentes.....	3
2.2.	Marco teórico.....	6
2.3.	Marco conceptual	6
2.4.	Marco geográfico	19
2.5.	Marco institucional	19
2.6.	Marco legal.....	19
3.	OBJETIVOS	21
3.1.	Objetivo general.....	21
3.2.	Objetivos específicos.....	21
4.	HIPÓTESIS	23
4.1.	Hipótesis de investigación	23
4.2.	Hipótesis estadística.....	23
5.	POBLACIÓN Y MÉTODOS	25
5.1.	Tipo y diseño de la investigación	25
5.2.	Unidad de análisis y de información	25
5.3.	Población.....	25
5.4.	Selección de sujetos a estudio.....	26
5.5.	Variables	27
5.6.	Recolección de datos	29
5.7.	Procesos	29
5.8.	Alcances y límites de la investigación	35
5.9.	Aspectos éticos de la investigación	35
6.	RESULTADOS	37
8.	DISCUSIÓN	41
9.	CONCLUSIONES	45
10.	RECOMENDACIONES	47
11.	APORTES	49
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
13.	ANEXOS	61

1. INTRODUCCIÓN

Guatemala presenta un rico acervo de conocimientos acerca del uso de plantas medicinales, herencia cultural que prevalece a través del tiempo, razón por la cual se aprovecha y utiliza gran variedad y riqueza natural de especies vegetales con fines curativos, gracias a su fácil acceso y bajo costo.^{1,2}

En la actualidad el uso de la medicina tradicional en la población guatemalteca ha aumentado principalmente ante la falta de cobertura de servicios de salud, falta de acceso a los medicamentos antimicrobianos por su alto costo. Tal es el caso del jugo de los cítricos los cuales se utilizan empíricamente en el tratamiento de faringoamigdalitis de origen bacteriano. Dicha patología es frecuente en los servicios de atención primaria en salud representando el 50% de las consultas por infecciones de la vía respiratoria superior, siendo la población pediátrica la más vulnerable.³⁻⁷

Considerando lo anterior se realizó una revisión de literatura nacional, donde se evidenció la falta de estudios que describan la acción antibacteriana del jugo de las variedades de limón: criollo (*Citrus aurantifolia Swingle*), persa (*Citrus latifolia Tanaká*), real (*Citrus limonum Burm*), lima (*Citrus limetta Risso*), jugo de limón comercializado (Rabinal®) y jugo de lima contra los patógenos frecuentemente asociados a infecciones respiratorias de la vía superior en este caso: *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615* y *Staphylococcus aureus metilino resistente*.

Lo cual condujo a la siguiente interrogante: ¿Cuál es la eficacia antibacteriana *in vitro* del jugo de limón persa (*Citrus latifolia Tanaka*), criollo (*Citrus aurantifolia Swingle*), limón real (*Citrus limonum Burm*), lima (*Citrus limetta Risso*) y jugo de limón comercializado (Rabinal®) en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% contra *Staphylococcus aureus metilino resistente* y *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615*?

Con la finalidad de responder dicha interrogante se plantearon los siguientes objetivos: determinar la eficacia antibacteriana *in vitro* del jugo de limón persa (*Citrus latifolia Tanaka*), criollo (*Citrus aurantifolia Swingle*), limón real (*Citrus limonum Burm*), lima (*Citrus limetta Risso*) y jugo de limón comercializado (Rabinal®); comparar el efecto

inhibitorio del jugo de las variedades de cítricos a estudio y del jugo de limón comercializado (Rabinal®) a concentraciones de 25, 50, 75 y 100%. Comprobar las variedades de cítricos que presentan mayor efecto inhibitorio, determinar la concentración mínima de jugo de los cítricos a estudio que presenten efecto inhibitorio *in vitro* contra *Staphylococcus aureus metilino resistente* y *Streptococcus β -hemolítico del grupo A*.

Para lograr estos objetivos se realizó un estudio experimental en el laboratorio clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala durante el periodo octubre-noviembre de 2017. Los resultados del presente estudio servirán para generar información científica que documente las propiedades antibacterianas *in vitro* del jugo de los cítricos a estudio.

2. MARCO DE REFERENCIA

2.2 Marco de antecedentes

En el año 1991 en Guatemala se realizó un estudio experimental para validar científicamente el uso de plantas medicinales, previamente se hizo tamizaje de las plantas con mayor uso en el país, se determinó la actividad antibacteriana in vitro de 154 plantas de uso popular para el tratamiento de infecciones entre ellas *Citrus aurantifolia*; se realizaron extractos utilizando como solvente n-hexano, acetona y etanol en nueve especies de bacterias entre las cuales figura *Staphylococcus aureus* mediante la utilización de método de difusión en agar. Los extractos del fruto de *Citrus aurantifolia* mostraron actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*.⁸

En India durante el año 2011 con el objetivo de evaluar la composición fitoquímica y la actividad antimicrobiana in vitro del *Citrus limón* (cáscara, semilla y jugo) en bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y hongos: *Candida albicans*, *M. canis*, *T. rubrum* y *A. niger* se realizó un estudio experimental haciendo uso de extractos de etanol, acetato de etilo y agua caliente de cáscaras, semillas y jugo de limón respectivamente. Se determinó que el extracto etanólico de la cáscara presentó una concentración inhibitoria mínima de 2,4mg/ml contra *Staphylococcus aureus*. El extracto metanólico y etanólico de la cáscara y semilla y del jugo de limón mostraron una zona de inhibición de 23mm, 25mm y 28mm respectivamente, contra *Pseudomonas aeruginosa* y la menor inhibición estuvo dada por el extracto de agua caliente de cáscaras de limón. En el análisis fitoquímico se aislaron los siguientes compuestos: en las semillas: taninos, glucósidos, azúcar y flavonoides mientras que las saponinas y flabotaninos estaban ausentes. En la cáscara: se aislaron taninos, azúcar reductor y flavonoides y al igual que en las semillas, los glucósidos, saponinas y flabotaninos también estaban ausentes.⁹

Un año después en el mismo país se realizó otro estudio experimental, con el fin de comprobar la eficacia antibacteriana in vitro de *Citrus aurantifolia* Linn contra *Staphylococcus aureus* en cultivo agar, mediante el método de difusión; se hizo uso de extractos de la hoja con la técnica de maceración usando como disolventes cloroformo 15%, etanol 18%, acetona 09%, éter de petróleo 11% e hidroalcohol 24%. El estudio demostró que el extracto hidroalcohólico de la hoja presentó actividad antibacteriana

con un porcentaje de inhibición de 85.7% (12mm), en comparación con gentamicina (14mm).¹⁰

En el año 2015 en Perú se realizó un estudio experimental, con el fin de determinar el efecto inhibitorio del jugo y desecado de limón *Citrus aurantifolia* en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Para evaluar y comparar el efecto inhibitorio *in vitro* en cepa de *Staphylococcus aureus* en cultivo de agar, se utilizó jugo de *Citrus aurantifolia* a concentraciones de 10, 20 y 30% durante 30, 60 y 90 minutos y desecado del jugo a concentraciones de 3, 6 y 9% durante 5, 10 y 15 minutos. La concentración inicial de *Staphylococcus aureus* fue de, 7.5×10^7 UFC/ml, con el jugo a concentración del 10% durante 30 minutos se observó una disminución de 5.75×10^6 UFL/ml y al 30% en 90 minutos fue de 18.5 UFC/ml; con respecto al desecado del jugo se obtuvo a concentración del 3% en cinco minutos, 7.45×10^4 UFC/ml y al 9% en 15 minutos 3.13×10^3 UFC/ml. La disminución de la concentración de *Staphylococcus aureus* (UFC/ml) fue proporcional a la concentración y tiempo de exposición del jugo y desecado de jugo respectivamente. El desecado de *Citrus aurantifolia* resultó ser más efectivo que el jugo para inhibir el crecimiento bacteriano.¹¹

Durante el año 2015 en Perú se realizó otro estudio experimental haciendo uso del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limón* (limón), determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de *Citrus limón* en cepas de *Staphylococcus aureus metilino resistente* en medio de Kirby Bauer mediante difusión en disco, se hizo uso de extracto etanólico de la cáscara a concentraciones de 5%, 25%, 50% y 75% utilizando vancomicina como control positivo. Los cuatro extractos etanólicos mostraron actividad inhibitoria contra la bacteria a estudio. El extracto al 75% mostro mayor actividad antimicrobiana con halos de inhibición de 10.2mm. El efecto antibacteriano de los extractos etanólicos fue inferior a la vancomicina.¹²

En el año 2016 en Nigeria se realizó un estudio experimental para evaluar la actividad antimicrobiana del *Citrus limón* contra *Streptococcus β -hemolítico del grupo A* y *Staphylococcus aureus*, en medio de difusión agar-sangre se inocularon 0.5ml de cada bacteria, se hizo uso de la semilla y cáscara de limón utilizando extractos acuoso, metanólico y etanólico. Las concentraciones 3.13mg/ml, 6,25mg/ml, 12,5 mg/ml, 25mg/dl y 50mg/dl mostraron inhibición del crecimiento de las bacterias a estudio con los extractos etanólico y metanólico de la semilla y cáscara respectivamente y del

extracto acuoso de la semilla únicamente la concentración de 50mg/ml mostró actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus*. Las concentraciones mínimas con acción bactericida de los extractos de metanol y etanol de las semillas contra *Streptococcus pyogenes* fueron de 6.25 mg/ml, contra *Staphylococcus aureus* fueron de 6.25mg/ml con el extracto metanólico, de 3.125mg/dl con el extracto etanólico. Los extractos de la semilla mostraron mayor actividad antibacteriana que los de la cáscara.¹³

Durante ese mismo año en Nigeria, se realizó otro estudio experimental para determinar la composición fitoquímica y las propiedades antifúngicas y antibacterianas del concentrado de jugo de cuatro variedades de cítricos: mandarina, limón, lima y uva. Se evaluaron las actividades antimicrobianas contra cinco bacterianas una de ellas fue *Staphylococcus aureus* y tres cepas de hongos. Los resultados del análisis fitoquímico revelaron la presencia de alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenos, saponinas, glucósidos cardíacos, y azúcares reductores. La concentración inhibitoria mínima del concentrado de jugo de limón fue de 25µg/ml y la concentración bactericida mínima fue de 50 µg/ml contra *Staphylococcus aureus*.¹⁴

En el año 2016 en Arabia se realizó un estudio experimental y análisis fitoquímico, haciendo uso de las hojas de *Citrus aurantifolia* para evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* contra cepas multiresistentes: *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris*. Dentro de la composición fitoquímica de la hoja se aislaron saponinas, antraquinonas y compuestos fenólicos. Se demostró que las cepas bacterianas a estudio mostraron leve o ninguna sensibilidad ante el extracto metanólico de las hojas.⁴

En el año 2017 en Brazil se realizó un estudio experimental y un análisis fitoquímico de la cáscara de *limón Tahiti (Citrus latifolia Tanaka)*, para determinar el efecto inhibitorio del *limón Tahití* contra *Staphylococcus aureus* se hizo uso de los extractos de acuosos fríos y calientes, extracto etanólico de la cáscara y del aceite esencial comercializado del limón. Se comprobó que el extracto etanólico al 10 y 20%, mostró mayor actividad inhibitoria en *Staphylococcus aureus* que los extractos acuosos. El extracto acuoso al 10% a temperatura ambiente presentó mayor actividad inhibitoria en comparación con el extracto acuoso caliente al 100%. Los extractos etanólico y

acuoso en comparación con el aceite esencial comercializado mostraron mejor actividad inhibitoria.¹⁵

2.2 Marco teórico

2.2.1 Teoría del germen microbiano

Con las contribuciones de Pasteur, Koch a finales del siglo XIX propone la teoría del germen microbiano la cual supone la implicación de gérmenes microbianos en la etiología de la enfermedad.^{16,17}

2.2.2 Teoría de las balas mágicas

A finales del siglo XX, Erhlich desarrolla la teoría de las balas mágicas, al referirse a la toxicidad selectiva que presentaban las sustancias quimioterapéuticas (presentes antes que los antibióticos), hacia los microorganismos patógenos pero no hacia las células humanas.^{16,17}

2.2.3 Teoría de Fleming

Con el descubrimiento de la penicilina, realizado por Fleming en 1928, el primer compuesto de origen natural que presenta actividad antibacteriana, descubierta de manera particular al observar como la presencia de un moho que invadía una placa de cultivo inhibía el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Se sembraron las bases para que la industria farmacéutica iniciara la producción de nuevos antibióticos para el tratamiento de enfermedades de origen infeccioso.^{16,17}

2.3 Marco conceptual

2.3.1. Especies de cítricos

Las especies de cítricos del género de *Citrus limón*, pertenecen a la familia de las Rutaceas, esta especie se originó en el sudeste de Asia: principalmente en el noreste de India. Dentro de su composición se incluyen: vitaminas especialmente las del complejo B1, 2, 3 y 6, minerales, carotenoides, azúcar, polisacáridos, ácidos orgánicos: cítrico, málico, fórmico y acético, lípidos y compuestos bioactivos: Fenólicos, flavonoides

y lemonoides que le confieren propiedades antimicrobianas las mismas están presentes en el jugo de los cítricos gracias al gran contenido de vitamina C, ácido cítrico y minerales.^{9,11,15}

2.3.2. Componentes del jugo de limón con propiedades antibacterianas

El jugo de limón es rico en ácidos: cítrico, málico, acético y fórmico que le confieren pH ácido (2.4), lo cual contribuye a la inhibición de la actividad de las enzimas y proteínas transportadoras de la bacteria y ocasiona desequilibrio de la membrana citoplasmática bacteriana, la cual se encarga de mantener la adecuada actividad enzimática a través de la regulación de la concentración y del equilibrio hidroelectrolítico (carga positiva en el medio extracelular (H), la carga negativa en el medio intracelular (OH)). Los ácidos del jugo de limón entre ellos el ácido cítrico se unen a los cationes divalentes de la membrana citoplasmática, para modificar su permeabilidad y facilitar el paso de los ácidos mediante transporte pasivo hacia el interior de la bacteria dando como resultado la coagulación de proteínas y descenso del pH interno, que va desde 5.5 hasta 5 lo cual ocasiona la muerte de la bacteria.¹¹

2.3.3. *Citrus aurantifolia* Swingle

Reino: Plantae. Clase: Magnoliopsida. Subclase: Rosidae. Orden: Sapindales. Familia: Rutaceae. Género: Citrus. Especie: aurantifolia. Su nombre científico es *Citrus aurantifolia* Swingle, sus nombres comunes son: "lima, limón agrio, limón liso o limonero (México), citronvert (Francia), limette o limone (Alemania) y limeira (Portugal)".¹⁸

2.3.3.1 Composición fitoquímica

En el fruto se han identificado compuestos: alcaloides; monoterpenos; δ -terpineno, α, β -pineno, mirceno, p-mirceno, terpinoleno, metilantranilato, flavonoides: Heterosidos; flavonicos como hesperidosido; flavón: diomósido; principios amargos; sesquiterpenos: limoneno".⁸ En la corteza se han aislado: aceite esencial: derivados terpénicos: limoneno, linalol, nerol. Cada 100g de jugo contiene: vitaminas: niacina 0.1mg, tiamina 0.02mg, riboflavina 0.02 mg, ácido ascórbico 25.0 mg. minerales: calcio 13.0 mg, fósforo 1.0 mg, hierro 0.4 mg. agua 91.8 g, proteína 0.3 g, cenizas 0.3 g,

grasa 0.3 g, carbohidratos 6.3g y fibra 1.0 g. a diferencia del aceite, el jugo de limón no contiene ácidos volátiles; el ácido cítrico y acético, le confieren efectos antimicrobianos.^{9,19,20}

2.3.4. Limón persa

Clase: Dicotiledóneas. Sub-clase: Arquiclamídeas. Orden: Geraniales. Suborden: Geraniíneas. Familia: Rutaceae. Subfamilia: Aurantioideas. Género: Citrus. Especie: *latifolia*.²¹

Su nombre científico es *Citrus latifolia Tanaká*, sus nombres comunes son: lima, limón Tahití y las principales especies son la *Tahití, Bearss, Hawaii, petrolera* y *cayena lisa*.^{22,23}

2.3.4.1. Composición fitoquímica

Cada 100g del fruto comestible contiene: vitaminas: B3 (niacina) 0.2 mg, B1 (tiamina) 0.04 mg, B2 (riboflavina) 0.02 mg, B6 (piridoxina) 0.6 mg, ácido ascórbico 29.1 g. Minerales: fósforo 18 mg, hierro 0.60, magnesio 6 g. ácido fólico 8mg, ácido pantoténico 0,2mg, ácido cítrico 7.50mg.²⁴

2.3.5. Limón real

Reino: Plantae. División: Magnoliopsida. Orden: Sapindales. Género: citrus. Especie: *limonum*,^{25,26} su nombre científico es *Citrus limonum Burm*. Sus nombres comunes son: limón real, verdadero o imperial, limón agrio, limón grande, limón de tierra, limón agrio, cidra.^{25, 26, 27}

2.3.5.1. Composición fitoquímica

Cada 100g del fruto comestible contiene: vitaminas: A 3 µg, tiamina 0.06mg, riboflavina 0.04mg, niacina 0.20mg, vitamina B6 0.080mg, folatos 10,6 µg, vitamina C 53.0mg. minerales: calcio 42mg, fosforo 20mg, magnesio 8mg, hierro 0.40mg, potasio 138mg, zinc 0.060mg, sodio 2mg. Grasa: total 0.300g, saturada 0.039g. Proteínas 0.60g, ceniza 0.40g, sacarosa 0.50 g. ácidos orgánicos: predomina el ácido cítrico 50g, seguido por ácido málico 0.60g, ácido pantoténico 0.2mg, acético y fórmico.^{26,27,28}

2.3.6. Lima

Reino: Plantae. División: Magnoliophyta. Orden: Sapindales Género: Citrus. Especie: Citrus limeta.²⁹

Su nombre científico es: *Citrus limetta* Risso. Sus nombres comunes son: lima de chichi, lima dulce, lima de Roma, lima bergamota.^{25,26,29}

Composición fitoquímica

2.3.6.1. Composición fitoquímica

Jugo: proteínas 0.42g, grasa total 0.07g, carbohidratos 8.42g, fibra total 0.40g, ceniza 0.31g, calcio 14mg, fósforo 14mg, hierro 0.09mg, potasio 117mg, sodio 2mg, zinc 0.08mg, magnesio 8mg, piridoxina 0.04mg, tiamina 0.03mg, rivo flavina 0.01mg, niacina 0.14mg, vitamina C 30mg, vitamina A 2mcg, ácidos monoinsaturados 0.01g, ácidos grasos poliinsaturados 0.02g, ácidos grasos saturados 0.01g, folato 10mcg.²⁸

2.3.7. Jugo de limón comercializado

Se obtiene al exprimir el fruto de limón, sin ser diluido, concentrado ni fermentado, sometido a un tratamiento adecuado que asegure su conservación en envases apropiados.³⁰

2.3.7.1. Composición química

Contiene 52.4g/l de acidez dada principalmente por el ácido cítrico (60 al 70%) en menor cantidad ácido málico y trazas de ácido oxálico; glucosa 7.9 g/l, fructosa 7.3 g/l y sacarosa 4.5 g/l. Minerales: potasio 1264.2mg/l, calcio 112mg/l, fosforo 306mg/l y magnesio: 92.6mg/l. Esperidina con una concentración variable de 257 a 484.4 mg/l. Pectinas de 164.8 a 550mg/l. Ácido cítrico anhidro: Máximo 8mg/100ml, mínimo 4.5g/100ml, ácido ascórbico 350mg/kg, aceite esencial 0.5 ml/kg, etanol 3g/kg.³⁰

2.3.8. Especificaciones del jugo de limón comercializado

Debe proceder de frutos de limón maduros y de buena calidad previamente lavados, en ocasiones puede contener cierta cantidad de pulpa sin presencia de residuos de la cáscara o semillas.³⁰

Generalmente debe estar libre de colorantes o sustancias artificiales que modifiquen su sabor y color natural. Los colorantes naturales con los que puede ser adicionado son: alfa, beta y ganma carotenos, alfa, beta y ganma-8 carotenol y beta apo-8 carotenoide.³⁰

Puede contener los siguientes preservantes: benzoato de sodio o ácido benzoico no mayor de 0.1%, ácido ascórbico o sus sales de sodio o potasio que no exceda 0.2%. Este jugo debe ser procesado y envasado de acuerdo a las prácticas higiénicas sanitarias indicadas en la norma COGUACOR NCO 34-136.³⁰

2.3.9. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena en el ser humano es capaz de colonizar la piel, la nariz (fosas nasales) y faringe; produce una serie de infecciones de la piel y tejidos blandos, puede ocasionar osteomielitis, artritis piogénica, abscesos profundos, neumonía, empiema, endocarditis, piomiositis, pericarditis y rara vez, meningitis. Incluye también las enfermedades mediadas por toxinas: intoxicación alimentaria, escarlatina estafilocócica y el síndrome de shock tóxico.³¹

2.3.9.1. Morfología

Son cocos gram positivos, en su forma individual presentan forma esférica miden aproximadamente 1 μm de diámetro se disponen en racimos similares a uvas también pueden estar dispuestos en pares o en cadenas cortas. Son catalasa positivo, no flagelados, inmóviles y no esporulados. Se desarrollan mejor en condiciones aeróbicas, pero son anaerobios facultativos. La pared celular está formada por peptidoglucanos que constituyen el exoesqueleto, está cubierta de polisacáridos y proteínas de superficie y de ácido teicoico.^{32,33}

Producen hemólisis, coagulan el plasma y producen enzimas y toxinas extracelulares que participan en su virulencia y son responsables del desarrollo de la resistencia a tratamientos antibióticos.^{32,33}

En medios de cultivo, las colonias suelen ser de color “gris a amarillo dorado profundo”, la temperatura óptima oscila de 35 a 40 °C con un pH de 7,0 a 7,5. En medios con agar presentan Beta- hemólisis, se pueden desarrollar en medios con NaCl (“medio selectivo de Chapman”). Su metabolismo es de tipo fermentativo.³²

2.3.9.2. Mecanismo de patogenicidad

En el mecanismo de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* participan el peptidoglucano de la pared celular, ácido teicoico, proteína A, cápsula y enzimas y toxinas.³²

Los peptidoglucanos proporcionan estabilidad osmótica a la pared celular de la bacteria, e inducen la producción de interleucina-1 y anticuerpos opsonicos que son quimio atrayentes leucocitarios. Presentan actividad endotóxica y participan en la activación del complemento.^{32,34}

Los ácidos teicoicos, en conjunto con el peptidoglucano pueden ser antigénicos. Participan en la regulación de la concentración catiónica de la membrana y se unen a la fibronectina.^{32,34}

La proteína A es una proteína de superficie pertenece al grupo de adhesinas denominadas componentes de superficie microbianos que son un importante factor de virulencia y tienen función ciliar, participa en la estimulación de la respuesta inflamatoria, media el daño tisular a través de la producción de radicales tóxicos de oxígeno.^{32,34}

La cápsula está presente en algunas cepas de *Staphylococcus aureus*, impide la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares.^{32,34}

La coagulasa presente en la superficie de la pared celular de la mayor parte de las cepas, genera agregación bacteriana mediante la unión no enzimática con el fibrinógeno.^{32,34}

2.3.9.3. Enzimas y toxinas

Estas sustancias extracelulares propician la diseminación y multiplicación bacteriana en los tejidos, generando enfermedad.³²

- Catalasa: media la conversión de peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno.³⁴
- Coagulasa: se encarga coagular el plasma citratado u oxalado. Se activa enzimáticamente al unirse con la protrombina e inicia la polimerización de la fibrina. Evita la fagocitosis al depositar fibrina en la superficie de los *Staphylococcus* por lo cual la presencia de coagulasa se considera el potencial invasor del patógeno.³²
- Hialorunidasas: participa en la hidrólisis de los ácidos hialurónicos presentes en el tejido conectivo, lo que facilita su diseminación en los mismos.³⁴
- Factor de aglutinación: permite la adherencia del patógeno a la fibrina y fibrinógeno. Al estar en el plasma se agrupa en forma de racimos. También desencadena una respuesta inmune en el huésped.^{32,34}
- Fibrinolisisina y lipasa: la primera se encarga de disolver coágulos de fibrina y la segunda produce hidrólisis de los lípidos.³⁴
- Nucleasa: ocasiona hidrólisis del ADN y la penicilinasas permite la hidrólisis de la penicilina.³⁴
- Toxinas exfoliativas o catalíticas (α , β , δ , γ): la toxina α se inserta en la bicapa lipídica de las membranas citoplasmáticas del hospedador generando lisis a través de la formación de poros.³³
- Exfoliatina: al enlazarse a un gangliosido específico presente en la pared celular del estrato granuloso de la epidermis queratinizada, ocasiona “disrupción de las uniones celulares” al generar la división intracelular entre el estrato espinoso y granuloso.³³
- Toxinas superantigénicas estafilocócicas: al ser absorbidas en el tracto intestinal estimulan efectos sistémicos. La toxina del síndrome del choque tóxico pertenece a este grupo, es altamente mitogénica para los linfocitos T,

al unirse al complejo de mayor histocompatibilidad clase II, estimula los linfocitos T y ocasiona una liberación masiva de citocinas lo que favorece las manifestaciones del síndrome de choque tóxico.^{32,33}

- Enterotoxinas (A-E, G-J, K-R y U, V): son súper antígenos responsables de las intoxicaciones alimentarias, cuando *Staphylococcus* está presente en alimentos ricos, hidratos de carbono y proteínas. Los vómitos y la diarrea se producen con la ingestión de 25 µg de enterotoxina B.³²
- Enterotoxina leucocidina de Panton-Valentine: esta toxina consta de dos componentes S y F que actúan sinérgicamente en la membrana de los leucocitos de los seres humanos y conejos ocasionando su destrucción.³²

2.3.9.4. Tratamiento

La penicilina G es el tratamiento comúnmente utilizado contra cepas sensibles de *Staphylococcus aureus*, sin embargo, en la actualidad menos del 10% de estas cepas es susceptible a ella, también muestran sensibilidad las cefalosporinas de primera generación (cefazolina), trimetoprim sulfametozol, amoxicilina más ácido clavulánico y ampicilina-sublactam. Para las cepas meticilino resistentes de *Staphylococcus aureus* a estos medicamentos o en pacientes con alérgicos a los betalactámicos, las alternativas son: vancomicina, clindamicina o eritromicina.^{33,34}

2.3.9.4 Vancomicina.

Es un antibiótico glucopéptido tricíclico de amplio espectro contra bacterias gram positivas.³⁵

- Mecanismo de acción

Actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular, impide que se desarrollen las reacciones de glucosidación mediante la unión al extremo terminal de D-alanil- D-alanina en las cadenas de los peptidoglucanos.^{35,36}

- Usos terapéuticos

Se emplea en el tratamiento de infecciones severas ocasionadas por estafilococos, estreptococos y enterococos susceptibles y resistentes a meticilina y en casos de hipersensibilidad a los β -lactámicos.^{35,37}

- Dosis y vía de administración

La vía de administración es intravenosa. Comercialmente el clorhidrato de vancomicina se distribuye como polvo estéril para dilución y su infusión debe ser lenta en un período no menor de 60 minutos.³⁵

- Dosis para adultos: 30 a 45 mg/kg al día cada 6 horas.³⁵
- Dosis pediátrica: lactantes: 10-15 mg/kg cada 6 horas.³⁵

La concentración inhibitoria mínima en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativos con sensibilidad intermedia, de 4 a 8 $\mu\text{g/ml}$, y en cepas resistentes es $\geq 16 \mu\text{g/ml}$.³⁵

2.3.10. Streptococcus β -hemolítico del grupo A

El *estreptococcus β -hemolítico del grupo A (EGA)*, o *Streptococcus pyogenes* es una bacteria que ocasiona patogenicidad en los seres humanos a través de la invasión local o sistémica. Produce diversas enfermedades: faringoamigdalitis aguda y sus complicaciones supurativas, fiebre puerperal, bacteremia/septicemia, afecciones de la piel: erisipela, celulitis, facitis necrosante (gangrena estreptocócica), piodermia estreptocócica, complicaciones postinfecciosas: fiebre reumática y glomerulonefritis postestreptocócica e infecciones invasivas: síndrome de choque tóxico estreptocócico y fiebre escarlatina.^{32,38}

2.3.10.1. Morfología y clasificación

Son bacterias gram positivas, en su forma individual son esféricos u ovoides y durante su replicación forman pares (diplococos) o cadenas (en forma de bastón). Su cápsula consta de ácido hialurónico, que participa en virulencia e impide la fagocitosis. En su pared celular están contenidas proteínas: Antígenos M, T y R, hidratos de carbono y peptidoglucanos. A través de la cápsula se proyectan fimbrias

filiformes que contienen proteína M y están recubiertas de ácido lipoteicoico que participa en la adherencia a las células epiteliales humanas. En los cultivos con agar sangre las colonias son pequeñas.³²

2.3.10.2. Clasificación hematológica

Es necesario realizar estudios *in vitro* en agar sangre para determinar reacción hemolítica que presentan. La hemólisis β se caracteriza por la lisis completa de los eritrocitos (gracias a la presencia de hemolisinas en el microorganismo), alrededor de las colonias bacterianas hay presencia de aclaramiento de la sangre. En la hemólisis α se produce destrucción incompleta de los eritrocitos, se reduce la hemoglobina y se forma una zona de decoloración verdosa en el agar. Gamma Hemolíticos: sin presencia de hemólisis, crecen sin modificar la apariencia del agar.^{32, 39,40}

2.3.10.3. Clasificación por serogrupos

Para determinar el grupo al que pertenecen se utiliza la clasificación de Lancefield, que consiste en identificar el aminoglucósido presente en los hidratos de carbono que forman parte de la pared celular. En el *Streptococcus del grupo A* está presente la ramnosa-N -acetilglucosamina.³²

2.3.10.4 Mecanismo de patogenicidad

En el mecanismo etiopatogénico participan: las proteínas M y F, el ácido teicoico, la cápsula, exotoxinas pirógenas, estreptolisinas S y O, estreptocinasa y desoxirribonucleasa.³⁹

La proteína M presente en la pared celular, constituye el principal factor de virulencia al impedir la fagocitosis al igual que la cápsula que crea una barrera para evitar la opsonización de la bacteria, permiten al microorganismo su supervivencia en el organismo del huésped. Para la adhesión a las células epiteliales humanas se requiere de la proteína F y del ácido teicoico. También participan las estreptolisinas: que son capaces de lisar glóbulos rojos y blancos, la estreptolisina S (oxígeno estable), induce y permite liberar el contenido de los lisosomas, a ella se atribuye la reacción hemolítica β en agar sangre. La estreptolisina O (oxígeno lábil) responsable de

la inducción de anticuerpos los cuales son inhibidos por lípidos cutáneos motivo por el cual están ausentes en infecciones de la piel. La diseminación bacteriana está dada por la estreptocinasa o fibronolisina y estreptodornasa o desoxirribonucleasa, que a nivel del ADN libre, ocasiona despolimerización. La acción de la hialuronidasa permite aumentar la permeabilidad de los tejidos y facilita el paso del microorganismo. Las exotoxinas pirógenas A, B y C (toxina eritrogénica) o superantígenos se unen al complejo de mayor histocompatibilidad clase II, estimulan los linfocitos T activados que ocasionan la lesión de los tejidos a través de la inducción y liberación de interleucinas, interferón gamma y factores de necrosis tumoral participan en el desarrollo de shock tóxico estreptocócico y las toxinas ocasionan exantema en la escarlatina.^{32,39}

En la infección faríngea el *Streptococcus β-hemolítico del grupo A*, está presente en la saliva y faringe, se puede adquirir mediante dos fuentes: vía respiratoria mediante la inhalación de gotas contaminadas expulsadas a través de la nariz al momento de estornudar o por la boca al toser (transmisión mano-mano), las gotículas infectadas también se esparcen en el ambiente: aire o polvo. El contacto directo con la piel de personas infectadas en el caso de infección cutánea (piodermia). La infección se propaga rápidamente al afectar la piel produce supuración local.^{39,40}

2.3.10.5. Tratamiento

Streptococcus β-hemolítico del grupo A, continúa siendo sensible a penicilina G, también lo es a ampicilina y amoxicilina. Las cefalosporinas presentan eficacia siendo superiores en algunos casos a las penicilinas.^{33,40}

Otras alternativas de tratamiento en el caso de presentar alergia a la penicilina son los macrólidos: eritromicina, azitromicina, claritromicina y lincosamida: clindamicina.^{33,40}

2.3.10.6. Azitromicina

Es un aminoglucósido, con actividad antibacteriana bacteriostática contra bacterias y cocos gram positivos.³⁵

- Mecanismo de acción

A nivel ribosomal se une a la sub-unidad 50S de la bacteria de manera reversible e inhibe la síntesis de proteínas.^{35,36}

2.3.10.8. Usos terapéuticos

Está indicada para el tratamiento de infecciones ocasionadas por cocos grampositivos, *Urea plasma urea lyticum*, *Clamidia*, *Mycoplasma pneumoniae* También es activa contra *Moraxella catarrhalis*, *Helicobacter pilory* y *Haemophilus influenzae*.^{35,36}

Vía de administración: oral

- Dosis adultos: en el caso de faringitis, neumonía adquirida en la comunidad o infecciones de la piel y tejidos blandos: 250 mg a 500mg al día durante 2 a 5 días.³⁵
- Dosis pediátrica: en el caso de amigdalitis o faringitis se calcula a 12 mg/kg/día por cinco días.³⁵

2.3.10.9. Eficacia antibacteriana

Consiste en la óptima destrucción de las bacterias mediante el uso de tratamiento antimicrobiano a dosis pre-establecidas. Emplea curvas que van con relación a la concentración y tiempo, a través de las cuales se calcula: la concentración y fracción máxima y el área bajo la curva, para medir la concentración total del fármaco en un período de tiempo de 0 a 24 horas. La eficacia antibacteriana es mayor con lapsos de tiempo largos y cuando la concentración del fármaco se mantiene por arriba de la concentración inhibitoria mínima, la cual se define como la menor concentración del agente antibacteriano capaz de impedir la proliferación de la bacteria posterior a las 18 a 24 horas de su aplicación.³⁵

2.3.11. Efecto inhibitorio

Está representado por la acción del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias conservando su viabilidad, es decir que puede reanudar su multiplicación al suspender la administración del mismo.⁴¹

2.3.12. Control positivo

Consiste en una muestra utilizada para demostrar un resultado positivo de la investigación. En este estudio se hizo uso de discos de antibiogramas que consisten en métodos in vitro elaborados por las casas comerciales bajo un estricto régimen de control de calidad, para determinar la susceptibilidad de determinados microorganismos al ser expuestos a determinado agente antimicrobiano, a una concentración preestablecida que se correlaciona con la concentración inhibitoria mínima in vivo tomando en cuenta la resistencia y sensibilidad del microorganismo a estudio. Estos deben ser refrigerados temperatura de 4 a 5⁰ C o congelados a -20⁰ C hasta su utilización para preservar su calidad.⁴¹

2.3.13. Control negativo

Es una muestra utilizada para eliminar posibles sesgos en un estudio experimental, la cual no se espera que presente actividad antimicrobiana.⁴³

2.3.14 Método de difusión en discos Kirby Bauer

Consiste en una prueba de sensibilidad utilizada en medios de cultivo, para ello se hace uso de discos de papel filtro los cuales se impregnan con agentes antimicrobianos, en este caso jugo de cítricos, y se colocan sobre la superficie de la caja de petri que contiene el medio de agar con el cultivo bacteriano que ha sido previamente incubado durante 18 a 24 horas. La interpretación de los resultados se basa en criterios preestablecidos: mediante las tablas de: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), que categoriza en sensible, intermedio o resistente.⁴²

2.3.15. Estándares de interpretación de zonas de diámetro

- Sensible: con la aplicación de un agente antimicrobiano a dosis pre- establecida para determinado microorganismo se obtiene éxito terapéutico.⁴¹

- Intermedio: se obtiene efecto terapéutico bajo condiciones relacionadas con la concentración del agente antimicrobiano, es decir se puede alcanzar aumentando la concentración, en este se utiliza la concentración inhibitoria mínima.⁴¹
- Resistente: al administrar un agente antimicrobiano a dosis preestablecidas no se obtiene éxito terapéutico.⁴¹

2.3.16. Medio de cultivo Mueller Hinton Agar

Este medio de cultivo es utilizado universalmente para la realización de pruebas de sensibilidad en microorganismos patógenos al exponerse a antimicrobianos a dosis preestablecidas. Para el cultivo de microorganismos nutricionalmente exigentes (por ejemplo: *Streptococos*) es útil adicionar al medio de cultivo sangre de carnero al 5%.⁴⁴

Composición del medio de cultivo Mueller Hinton Agar (Himedia®)

- Infusión de carne 300g/l
- Peptona ácida de caseína 17.5g/l
- Almidón 1.5g/l
- Agar 15g/l^{36,44}

2.4 Marco geográfico

El Laboratorio Clínico de Investigaciones Biomédicas, se encuentra localizado en el primer nivel del Edificio D del Centro Universitario Metropolitano -CUM-, en la 9ª avenida 11-45 zona 11, Guatemala.

2.5 Marco institucional

El estudio experimental fué realizado en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas, el cual promueve y apoya la investigación científica en la comunidad estudiantil de la Universidad San Carlos de Guatemala.

2.6 Marco legal

Constitución Política de la República de Guatemala. Capítulo II Derechos sociales. Sección quinta. Universidades.

Artículo 82. “Autonomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. La Universidad de San Carlos de Guatemala, es una institución autónoma con personalidad jurídica. “Promoverá por todos los medios a su alcance la investigación en todas las esferas del saber humano y cooperará al estudio y solución de los problemas nacionales”.⁴⁵

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la eficacia antibacteriana *in vitro* del jugo de limón persa (*Citrus latifolia Tanaká*), limón criollo (*Citrus aurantifolia Swingle*), real (*Citrus limón Burm*), lima (*Citrus limetta Risso*) y jugo de limón comercializado (Rabinal®) contra *Staphylococcus aureus metilcilino resistente* y *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615* de octubre a noviembre del 2017 en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Comparar el efecto inhibitorio del jugo de las variedades de cítricos a estudio y del jugo de limón comercializado (Rabinal®) a concentraciones de 25, 50, 75 y 100% contra *Staphylococcus aureus metilcilino resistente* y *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615*.
- 3.2.2 Comprobar cuál de las variedades de cítricos presenta mayor efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus metilcilino resistente* y *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615*.
- 3.2.2 Determinar la concentración mínima de jugo de los cítricos a estudio que presenten efecto inhibitorio *in vitro* contra *Staphylococcus aureus metilcilino resistente* y *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615*.

4. HIPÓTESIS

4.1 Hipótesis de Investigación

4.1.1 Hipótesis nula: la utilización del jugo de limón persa (*Citrus latifolia Tanaká*), limón criollo (*Citrus aurantofilia Swingle*), real (*Citrus limón Burm*), lima (*Citrus limetta Risso*) y jugo de limón comercializado (Rabinal®), no presentan eficacia antibacteriana *in vitro* contra las cepas de *Staphylococcus aureus metilino resistente* y *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615*.

4.1.2 Hipótesis alternativa: la utilización del jugo de limón persa (*Citrus latifolia Tanaká*), limón criollo (*Citrus aurantofilia Swingle*), limón real (*Citrus limón Burm*), lima (*Citrus limetta Risso*) y jugo de limón comercializado (Rabinal®) presentan eficacia antibacteriana *in vitro* contra las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615*.

4.2 Hipótesis estadística

4.2.1 Hipótesis nula: $p > 0.05$.

4.2.2 Hipótesis alternativa: $p \leq 0.05$.

5. POBLACIÓN Y MÉTODOS

5.1 Tipo y diseño de la investigación

- Tipo: cuantitativo
- Diseño de investigación: estudio experimental

5.2 Unidad de análisis y de información

5.2.1 Unidad de análisis

Se utilizaron cajas de petri con la siembra de las cepas de *Staphylococcus aureus metilino resistente* y *Streptococcus β -hemolítico del grupo A ATCC 19615*, jugo de las tres variedades de limón, jugo de lima y jugo de limón comercializado (Rabinal®), a diferentes concentraciones y antibiogramas (Himedia®) de vancomicina y azitromicina.

5.2.2 Unidad de información

Se hizo uso de antibiogramas (Himedia®) de vancomicina y azitromicina por medio de la réplica del método Bauer-kirby en cultivos de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus β -hemolítico del grupo A*.

Se registraron los diámetros de los halos de inhibición en los cultivos medidos milimétricamente para determinar el efecto inhibitorio.

5.3 Población y muestra

5.3.1 Universo

Bacterias grampositivo.

5.3.2 Población

16 cajas de Petri con medio de cultivo Müller Hinton agar que contenían cepas de *Staphylococcus aureus* metilino resistente (aislado clínico) y *Streptococcus* β -hemolítico del grupo A a ATCC 19615.

5.4 Selección de sujetos a estudio

5.4.1 Criterio de inclusión

Cepa de *Staphylococcus aureus* metilino resistente (aislado clínico) y *Streptococcus* β -hemolítico del grupo A a ATCC 19615 pertenecientes al cepario del Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas.

5.5. Operacionalización de las variables

Variables	Definición conceptual	Definición Operacional	Tipo de Variable	Escala de medición	Escala de clasificación
Eficacia antibacteriana	Consiste en la destrucción óptima de las bacterias a través del uso de antimicrobianos a dosis preestablecidas. ³⁵	Halo de inhibición medido en milímetros sobre las cajas de Petri que contengan cultivo de las bacterias y jugo de las variedades de cítricos a estudio a concentraciones de 25, 50, 75 y 100% comparado con los controles positivos.	Cuantitativa continua	Razón	Milímetros
Efecto inhibitorio in vitro	Capacidad para evitar la reproducción y crecimiento de un microorganismo haciendo uso de antimicrobianos a concentraciones y dosis preestablecidas. ^{35,41}	Halo de inhibición medido en milímetros sobre las cajas de Petri que contengan cultivo de las bacterias y jugo de las variedades de cítricos a estudio para cuantificar la zona inhibición. "Determinación del % del efecto inhibitorio: % Efecto Inhibitorio= [(Diámetro del halo inhibitorio del extracto en mm)/ (Diámetro del halo inhibitorio del control positivo en mm)] x 100" ⁴⁷	Cuantitativa continua	Razón	Porcentaje

<p>Inhibición bacteriana</p>	<p>Detención del crecimiento y proliferación bacteriana sin ocasionar muerte de las mismas. ³⁵</p>	<p>Observación de las placas de petri con medio de cultivo Mueller Hinton que contengan siembra bacteriana y jugo de los cítricos a estudio a concentraciones de 25, 50, 75 y 100% mediante la técnica de Bauer Kirby posterior a las 18 a 24 horas de incubación.</p>	<p>Cualitativa dicotómica</p>	<p>Nominal</p>	<p>Hay inhibición No hay inhibición</p>
-------------------------------------	---	--	-------------------------------	----------------	--

5.6 Recolección de datos

5.6.1 Técnicas de recolección de datos

Se realizó mediante el instrumento de recolección de datos (ver anexos tabla 5 y 6), que incluye cada variedad de jugo de cítricos a estudio (persa: *Citrus latifolia Tanaká*, limón criollo: *Citrus aurantifolia Swingle*, real: *Citrus limonum Risso*, lima: *Citrus limetta Risso*) y jugo de limón comercializado (Rabinal®), a concentraciones de 25, 50, 75 y 100% y control positivo y negativo para cada bacteria estudiada.

5.7 Procesos

5.7.1. Selección de las variedades de limón

Las variedades de cítricos estudiadas: limón persa (*Citrus latifolia Tanaká*), limón criollo: (*Citrus aurantifolia Swingle*), real (*Citrus limonum Risso*), lima (*Citrus limetta Risso*) y jugo de limón comercializado (Rabinal®), se obtuvieron de la Escuela Nacional Central de Agronomía, posteriormente fueron identificadas taxónómicamente por el Ingeniero Agrónomo: Mario Esteban Véliz Pérez Coordinador-Curador del Herbario BIGU, de la Escuela de Biología Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad San Carlos de Guatemala. El jugo de limón comercializado (Rabinal®) se compró en Walmart, diagonal 3 17-07 Calzada Atanasio Tzul zona 12 entre 17 y 18 calle.

5.7.2. Obtención del jugo de los cítricos estudiados:

- Se lavaron las especies de cítricos utilizados con abundante agua y jabón antibacterial marca “Olimpo”, fueron desinfectados en un recipiente con hipoclorito de sodio en el cual se dejaron reposar por 15 minutos y luego fueron enjuagados con agua tridestilada.
- El jugo de las tres variedades de limón estudiadas y jugo de lima previa eliminación de las semillas, se obtuvo exprimiendo mediante un extractor metálico

para jugo previamente esterilizado en autoclave, este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-.

- El jugo obtenido de cada variedad de cítrico fue conservado en frascos color ámbar estériles, los cuales fueron almacenados a 4⁰ C hasta su utilización.¹¹
- Se utilizó etanol al 50% para realizar las diluciones al 25, 50, 75 y 100%.

5.7.3. Obtención de las cepas bacterianas

Las cepas de *Staphylococcus aureus* metilino resistente (aislado clínico) y *Streptococcus* β -hemolítico del grupo A a ATCC 19615, se obtuvieron del cepario pertenecientes al laboratorio clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad San Carlos de Guatemala.

5.7.4. Siembra bacteriana

- Se seleccionaron 4 colonias de *Staphylococcus aureus* metilino resistente y 4 colonias de *Streptococcus* β -hemolítico del grupo A a ATCC 19615 del cultivo original.
- Las colonias se transfirieron mediante un asa bacteriológica estéril a un tubo que contenía 5 cc caldo estéril de tripticasa-soya.^{41,46,47.}
- Se incubaron a 36⁰ C durante 15 minutos y se determinó la turbidez de McFarland: se diluyó el cultivo con solución salina estéril, hasta lograr una turbidez equivalente al tubo de 0.5 de la escala de McFarland lo cual corresponde a 10⁸ unidades formadoras de colonias por ml.^{41,46}
- Se impregnó un hisopo estéril en el caldo tripticasa-soya, el cual se rotó sobre las paredes del tubo para remover el exceso y a continuación se sembró la muestra bacteriana sobre la caja de Petri con agar Müeller Hinton, en tres direcciones: horizontal, vertical y diagonal.⁴⁶
- Se trabajó con 16 cajas de petri: 6 cajas de petri para *Staphylococcus aureus* metilino resistente y 6 cajas para *Streptococcus* β -hemolítico del grupo A a ATCC 19615, 1 caja de petri para cada una de las variedades de cítricos y jugo de limón comercializado (Rabinal®), a concentraciones de: 25, 50, 75 y 100%, 1 para el control positivo y 1 para el control negativo de cada bacteria respectivamente.

- Se dejó secar la siembra bacteriana durante 20 minutos, con la tapa de la caja cerrada.^{44,48}
- Se incubó a 35°C durante 24 horas hasta observarse un crecimiento bacteriano moderado.^{44,48}

5.7.5. Método de impregnación de los discos de papel filtro con el jugo de cítricos a estudio.

- Se hizo uso de discos de papel filtro de 6 milímetros de diámetro, los cuales se obtuvieron haciendo uso de un sacabocados y posteriormente fueron esterilizados en autoclave.⁴⁶
- Cada disco de papel filtro se impregnó con una gota de 20µl de jugo, medido con micropipeta automática utilizando un disco para cada variedad de cítrico a concentraciones de 25, 50, 75 y 100%.⁴⁶
- En la superficie del cultivo Müeller Hinton agar mediante el uso de pinzas estériles, se colocaron los discos; para lograr un contacto uniforme se hizo presión leve sobre los ellos.⁴⁸
- Los discos se colocaron en la periferia de la caja de petri que contenía medio de cultivo Müeller Hinton agar dejando una distancia de dos centímetros entre cada disco para evitar el contacto con las zonas de inhibición que pudieran dificultar la medición al momento de la lectura.⁴⁹
- Las cajas de petri que contenían el medio de cultivo, la siembra bacteriana y los discos se incubaron a una temperatura de 35°C durante 24 horas. Procediendo posteriormente a la medición milimétrica con una regla transparente.⁴¹

5.7.6. Controles positivos y negativos

- Control positivo: se utilizaron antibiogramas marca Himedia®. Para *Staphylococcus aureus metilino resistente* se utilizó vancomicina a concentración de 30mcg y para *Streptococcus β-hemolítico del grupo A* se hizo uso de azitromicina a una concentración de 15mcg. Los cuales se colocaron sobre la superficie del medio de cultivo con la siembra bacteriana y se incubaron durante 24 horas.⁴⁴

- Control negativo: se impregnaron dos discos de papel filtro previamente esterilizados en autoclave, con una gota de 20 μ l de solución salina al 0.9%, se dejó secar y se colocaron sobre la superficie del medio de cultivo Müller Hinton agar con el cultivo bacteriano y se incubó durante 24 horas.⁴¹

5.7.7. Técnicas de laboratorio

- Método de difusión en discos de Bauer-kirby (técnica 1): se dejaron secar los discos de papel filtro impregnados con el jugo de cítrico a estudio, a 37⁰ C en una incubadora antes de suspenderlos sobre el medio de cultivo.⁴⁶

Adaptación de la técnica de Bauer Kirby a gota directa (técnica 2)

- Técnica 2: colocación de gota directa. Se administró una gota de 20 μ l del jugo de los cítricos a estudio directamente sobre el medio de cultivo que contenía las bacterias estudiadas.⁵⁰
- Medición de halos: la susceptibilidad de las bacterias al exponerse al jugo de los cítricos estudiados se expresó como las zonas de inhibición de crecimiento en milímetros mediante el uso de una regla transparente y los resultados fueron comparados con los controles positivos y negativos.^{11,46}

5.7.8. Preparación del medio de cultivo Müller Hinton agar

- En un erlenmeyer se agregó 1 litro de agua destilada y disolvió 38g del polvo Müller Hinton agar 500g (Himedia M173®).
- Se calentó la solución en un hot plate mezclando suavemente hasta que se disolvió totalmente.
- Se esterilizó el medio de cultivo en autoclave a 121⁰ C durante 15 minutos y se dejó enfriar hasta lograr una temperatura de 40-45⁰ ; se añadió 5% de sangre desfibrinada de cordero la cual fue proporcionada en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas.
- Se agregó 15 a 20ml de agar Müller Hinton en cada caja de Petri y dejó solidificar.

- Las cajas de Petri fueron almacenadas con medio de cultivo agar Müeller Hinton a temperatura que oscilaban entre 2 a 8 ° C hasta su utilización.
- Se dejó reposar el medio de cultivo durante 15 minutos y luego se incubó a 36⁰ C durante 24hrs.^{48,49}

5.7.9. Interpretación de antibiogramas

Para determinar la eficacia antibacteriana del jugo de los cítricos a estudio en sus diferentes concentraciones se midió las zonas de inhibición en milímetros y se hizo comparación de los resultados obtenidos con los controles positivos de azitromicina y vancomicina según los diámetros de inhibición establecidos en las tablas de la National Comitee for Clinical Laboratory Samples -NCCLS- para determinar si las cepas bacterianas eran sensibles, resistentes o presentaban sensibilidad intermedia al exponerse al jugo de los cítricos a estudio a diferentes concentraciones.⁴²

Azitromicina 15mcg (Himedia ®) contra *Streptococcus pyogenes*.

- Resistente: ≤13mm
- Intermedio: 14-22mm
- Sensible: ≥ 23mm^{51,52,53}

Vancomicina 30mcg (Himedia ®) contra *Staphylococcus aureus meticulo resistente*.

- Resistente: ≤14mm
- Intermedio 15-16mm
- Sensible: ≥ 17-19 mm.^{52,54}

5.7.10 Instrumentos

El instrumento de medición que se utilizó consiste en una tabla de recolección de datos (ver anexo tablas 5 y 6) de la medición de la zona de los halos de inhibición en milímetros que contenía cada variedad de jugo de cítricos a estudio en sus diferentes concentraciones con su respectiva cepa bacteriana, control positivo y

negativo. Se realizaron anotaciones de los resultados obtenidos posterior a las 24 hrs de incubación comparando dichos resultados con los controles positivos de azitromicina (Himedia®) en el caso de *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615* y vancomicina (Himedia®) en *Staphylococcus aureus meticilino resistente*. Los materiales que se utilizaron

- Regla plástica para la medición en milímetros de los halos de inhibición.
- Placa Müller Hinton para el cultivo y siembra bacteriana.

5.7.11 Procesamiento y análisis de datos

Con los datos obtenidos en el instrumento de recolección (ver anexos tablas 5 y 6) se creó una base de datos en Microsoft Excel 2016 mediante la cual se calculó la media y varianza de cada uno de los cítricos estudiados a diferentes concentraciones (ver anexos tablas 7 y 8) y se realizaron gráficas y tablas para la presentación de resultados. Posteriormente se trasladaron los datos al programa R Project versión 3.4.2 mediante el cual se emplearon los test de: Shapiro Wilk y Wilcoxon.

5.7.12 Análisis de datos

- Estadística analítica:

Los resultados obtenidos se procesaron en el programa R Project versión 3.4.2, se realizó un análisis descriptivo multivariado para determinar la normalidad de la distribución de los datos con el test de Shapiro Wilk.

Determinación de la normalidad de la muestra:

Test de Shapiro Wilk	Estadístico	Valor P
	0.80384	9.793e-05

En este caso se obtuvo un valor p menor de 0.05 con lo cual se rechaza la normalidad de la distribución de los datos, se recurrió a estadística no paramétrica para el análisis de las hipótesis planteadas.

Se aplicó la prueba de Wilcoxon obteniéndose un valor-p de 0.8166, por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula y se concluye que no hay suficiente evidencia para afirmar que el jugo de limón de las variedades estudiadas es eficaz para inhibir el crecimiento de *Streptococcus β-hemolítico*

del grupo A a ATCC y *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, según los métodos aplicados en el laboratorio.

5.8 Alcances y límites de la investigación

5.8.1. Obstáculos

Por ser un estudio experimental dentro del laboratorio clínico este se realizó de forma controlada de acuerdo a un protocolo de investigación preestablecido y con las debidas medidas de bioseguridad por lo cual no se presentó ningún obstáculo durante la realización del presente estudio.

5.8.2. Alcances

El estudio experimental se realizó con cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (aislado clínico) y *Streptococcus* β -hemolítico del grupo A a ATCC 19615 y se documentó con base científica el efecto inhibitorio *in vitro* presentado por las cuatro variedades de jugo de limón estudiadas contra *Streptococcus* β -hemolítico del grupo A a ATCC 19615 y proporciona una guía descriptiva para realizar la réplica del método de Bauer Kirby mediante difusión en disco y gota directa, los pasos para la preparación del medio de cultivo de Mùeller Hinton agar que será de utilidad en futuras investigaciones realizadas dentro del laboratorio clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas.

5.9. Aspectos éticos de la investigación

5.9.1. Principios éticos generales

Por ser este estudio de tipo experimental se consideraron los principios de bioseguridad para evitar daños al medio ambiente. Se tomó en cuenta la declaración de Helsinki II: inciso 11 de los principios generales. “La investigación médica debe realizarse de manera que reduzca al mínimo el posible daño al medio ambiente”.^{12,42}

Manejo de desechos bioinfecciosos: Las cajas de Petri que contenían el medio de cultivo y cepas bacterianas utilizadas para la realización del estudio fueron depositadas debidamente selladas en bolsa color rojo para recibir manejo y tratamiento adecuado a través de la empresa ECOTERMO.

5.9.2 Categoría de riesgo

La investigación pertenece al grupo de riesgo I. Se trabajó con cepas bacterianas pertenecientes al cepario del laboratorio clínico del Centro de investigaciones Biomédicas, manipulándolas bajo medidas de bioseguridad estrictas (usando guantes, batas descartables y mascarillas) dentro del laboratorio clínico en un área destinada para dicho fin.

6. RESULTADOS

La información que a continuación se detalla fue obtenida mediante un estudio experimental realizado en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala utilizando jugo de limón persa (*Citrus latifolia Tanaká*), criollo (*Citrus aurantifolia Swingle*), real (*Citrus limonum Burm*), lima (*Citrus limetta Risso*) y jugo de limón comercializado (Rabinal®) en concentraciones de 25, 50, 75 y 100% haciendo uso de la técnica de difusión de Bauer-kirby mediante discos de papel filtro y adaptación de la técnica de Bauer Kirby con gota directa aplicados a cepas de *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615* y *Staphylococcus aureus meticilino resistente*. Se incluyeron para el estudio 16 cajas de Petri con medio de cultivo Mueller Hinton agar que contenía 4 colonias de: *Staphylococcus aureus meticilino resistente (aislado clínico)* y 4 colonias *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615*.

Los resultados obtenidos son presentados de la siguiente manera:

- Comparación del efecto inhibitorio del jugo de las variedades de cítricos a estudio y del jugo de limón comercializado (Rabinal®) a concentraciones de 25, 50, 75 y 100%.
- Variedades de cítricos que presentan mayor efecto inhibitorio.
- Concentración mínima de jugo de los cítricos a estudio que presentan efecto inhibitorio *in vitro* contra *Staphylococcus aureus meticilino resistente* y *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615*.
- Determinación de eficacia antibacteriana *in vitro* del jugo de limón persa (*Citrus latifolia Tanaká*), criollo (*Citrus aurantifolia Swingle*), limón real (*Citrus limonum Burm*), lima (*Citrus limetta Risso*) y jugo de limón comercializado (Rabinal®).

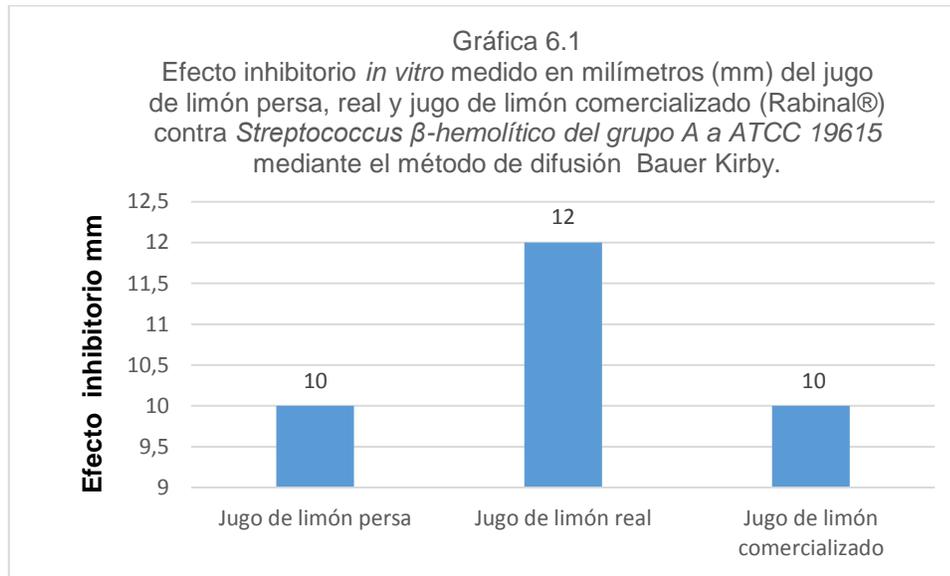
Tabla 6.1 Efecto inhibitorio *in vitro* medido en milímetros (mm) del jugo de limón persa, criollo, real, lima y jugo de limón comercializado (Rabinal®) contra *Streptococcus β-hemolítico del grupo A* a ATCC 19615 mediante método de difusión en disco de Bauer kirby.

Variedad de cítrico	Concentración de cada variedad de cítrico			
	25%	50%	75%	100%
Jugo de limón persa	-	-	7 mm	10 mm
Jugo de limón criollo	-	-	7 mm	9 mm
Jugo de limón real	-	-	7 mm	12 mm
Jugo de lima	-	-	-	-
Jugo de limón comercializado	-	-	-	10 mm
Control positivo de azitromicina contra <i>Streptococcus β-hemolítico del grupo A</i> a ATCC 19615.	23 mm			
Control negativo con solución salina	-			

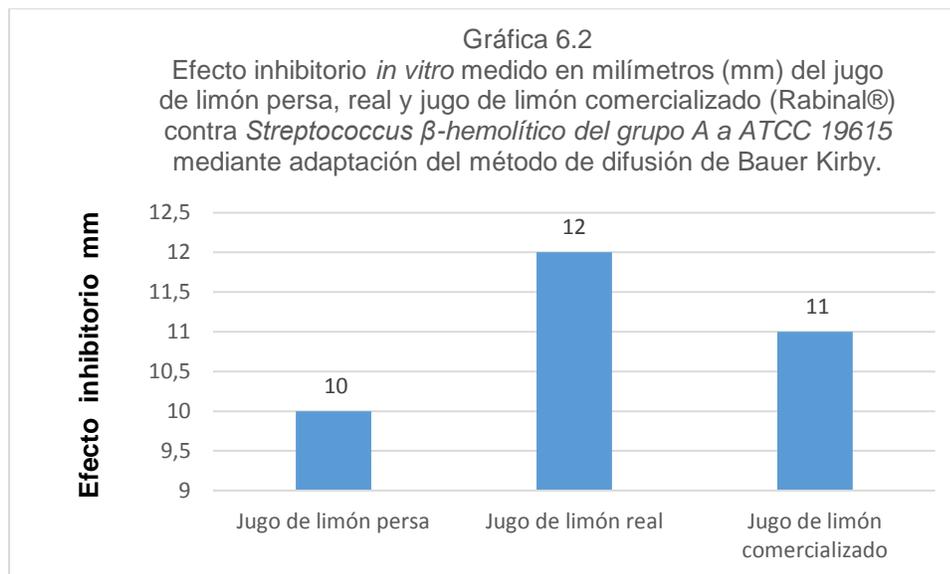
Tabla 6.2 Efecto inhibitorio *in vitro* medido en milímetros (mm) del jugo de limón persa, criollo, real, lima y jugo de limón comercializado (Rabinal®) contra *Streptococcus β-hemolítico del grupo A* a ATCC 19615 mediante la adaptación método de difusión en disco de Bauer Kirby con gota directa.

Variedad de cítrico	Concentración de cada variedad de cítrico			
	25%	50%	75%	100%
Jugo de limón persa	-	6 mm	10 mm	10 mm
Jugo de limón criollo	-	7 mm	8 mm	9 mm
Jugo de limón real	-	9 mm	9 mm	12 mm
Jugo de lima	-	-	-	-
Jugo de limón comercializado	-	9 mm	9 mm	11 mm
Control positivo de azitromicina contra <i>Streptococcus β-hemolítico del grupo A</i> a ATCC 19615.	23 mm			
Control negativo con solución salina	-			

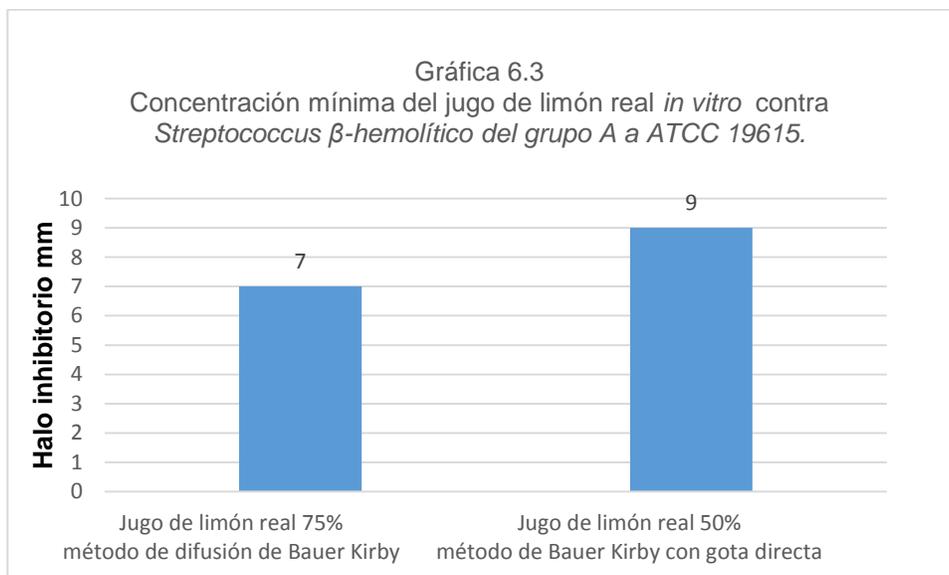
No se obtuvo efecto inhibitorio *in vitro* con el uso del jugo de limón persa (*Citrus latifolia* Tanakà), criollo (*Citrus aurantifolia* Swingle), real (*Citrus limón* Burm), lima (*Citrus limetta* Risso) y jugo de limón comercializado (Rabinal®) contra *Staphylococcus aureus* meticilino resistente con ninguna de las dos técnicas utilizadas.



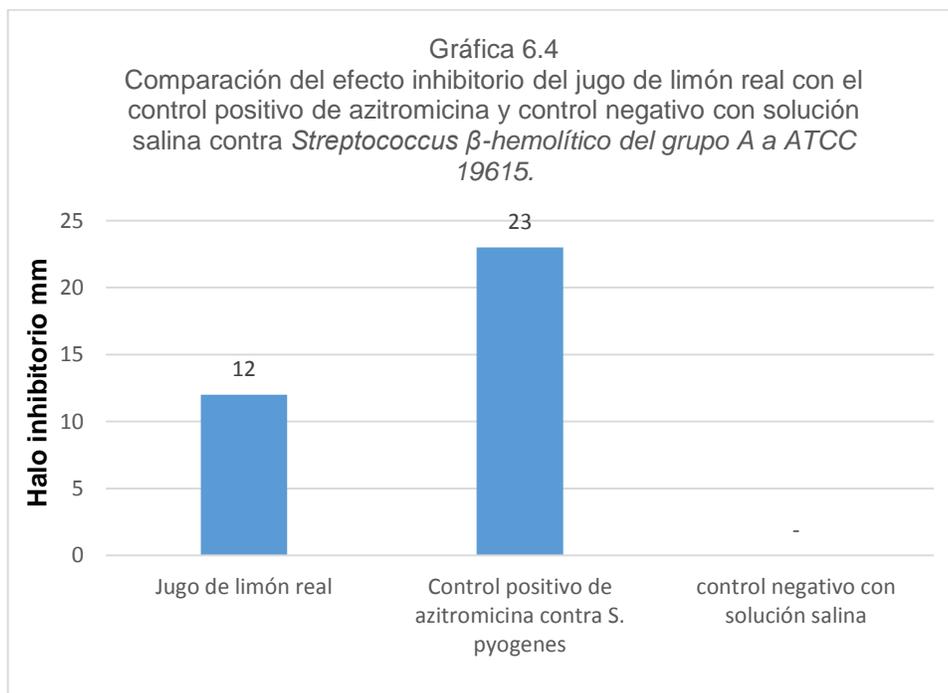
Fuente: Tabla 12.5, anexo 12.2



Fuente: Tabla 12.6, anexo 12.2



Fuente: Tabla 12.7, anexo 12.2



Fuente: Tabla 12.8, anexo 12.2

Los cítricos estudiados no son eficaces para la inhibición *in vitro* de *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC* y *Staphylococcus aureus metilino resistente*, para dicha afirmación se aplicó la prueba de Wilcoxon y se obtuvo un valor p de 0.8166, por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula.

7. DISCUSIÓN

En Guatemala, desde tiempos ancestrales, se ha practicado la medicina tradicional la cual se ha transmitido de generación en generación y su uso en la actualidad ha ido en aumento, cada día se aprovecha y utiliza la gran variedad y riqueza natural de especies vegetales por los diferentes grupos étnicos con fines curativos gracias a su fácil acceso y bajo costo principalmente ante la falta de cobertura en servicios de salud y el difícil acceso a los medicamentos antimicrobianos por su alto costo. Sin embargo, el uso de muchas de estas plantas medicinales se realiza empíricamente y se carece de información que documente con bases científicas sus propiedades antimicrobianas *in vitro*.

El presente estudio experimental fue realizado con el fin de conocer la eficacia antibacteriana *in vitro* del jugo de limón persa (*Citrus latifolia*), limón criollo (*Citrus aurantifolia*), limón real (*Citrus limón Burm*), lima (*Citrus limeta Risso*) y jugo de limón comercializado (Rabinal®) a concentraciones de 25, 50, 75 y 100% contra *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615* y *Staphylococcus aureus meticilino resistente* (aislado clínico).

Todas las variedades de jugo de limón estudiadas excepto el jugo de lima (*Citrus limeta Risso*), mostraron efecto inhibitorio (halo de inhibición) *in vitro* contra *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615*. Con la técnica número 1: método de impregnación de discos de Bauer Kirby, se observó concentración mínima inhibitoria a partir de la concentración al 75% y con la técnica número 2: adaptación del método de Bauer Kirby a gota directa, se obtuvo a partir de la concentración al 50%; demostrando que esta última técnica resultó ser más efectiva. La diferencia de resultados con la utilización de ambas técnicas se explica porque con la impregnación de los discos con el jugo de los distintos cítricos estudiados, al momento de la incubación, para lograr que se sequen a temperatura ambiente, existe el proceso de evaporación que pudo haber influido en la disminución de la concentración del jugo.

Los resultados obtenidos en la presente investigación difieren con el estudio realizado en el año 2013 en Irak, en cuanto a la inhibición bacteriana *in vitro* a concentraciones al 100% con el jugo de *Citrus* limón contra *Streptococcus β-hemolítico del grupo A*, con el que se obtuvo un halo inhibitorio de 20mm, por lo cual llama la atención que en este estudio emplearon el método de difusión en pocillos de agar, con el que el efecto inhibitorio fue superior. También hicieron uso del jugo de *Citrus* limetta y al igual que en la presente

investigación, la inhibición obtenida fue nula para *Streptococcus β -hemolítico del grupo A* y *Staphylococcus aureus*.⁵⁵

De las variedades de jugo de cítricos estudiados el jugo de limón real al 100% fue el que presentó mayor efecto inhibitorio *in vitro* contra *Streptococcus β -hemolítico del grupo A a ATCC 19615*, mostrando un halo de inhibición de 12mm que representa el 52,2% de inhibición con respecto al control positivo de azitromicina 23mm. Le siguen: El jugo de limón comercializado con un halo inhibitorio de 11mm (42,2%), jugo de limón persa con un efecto inhibitorio de 10mm (43.4%) y jugo de limón criollo con un halo de inhibición de 9mm (39,13%).

No se obtuvo efecto inhibitorio *in vitro* con ninguna de las variedades de cítricos estudiados contra *Staphylococcus aureus meticilino resistente* (aislado clínico). Considerando que esta bacteria proviene de un aislado clínico de origen nosocomial, ha estado expuesta a múltiples fármacos y tiene la capacidad genética de adquirir y así mismo de transmitir resistencia a los antibióticos gracias a su barrera de permeabilidad que está dada por su pared celular y la capacidad de provocar inactivación enzimática o alteración de los sitios diana de acción en los cuales actúa el antibiótico.^{55,56}

Aunque el efecto inhibitorio *in vitro* contra *Staphylococcus aureus meticilino resistente* (aislado clínico) fue nulo, no se descarta que las diferentes partes del fruto principalmente la cáscara; Por su alto contenido de ácidos volátiles, presente efecto inhibitorio; En Perú en el año 2015 se realizó un estudio experimental en el cual utilizaron el extracto etanólico de la cáscara de cítricos al 75% que mostró halos de inhibición de 10.2mm contra *Staphylococcus aureus meticilino resistente*. Pero el jugo de limón no mostró efecto inhibitorio *in vitro* contra *Staphylococcus aureus meticilino resistente*.⁵⁶

Ninguna de las variedades del jugo de cítricos estudiadas demostró eficacia antibacteriana *in vitro superior* a la presentada por el control positivo con azitromicina (Himedia®) contra *Streptococcus β -hemolítico del grupo A a ATCC 19615*, pero no se rechaza la probabilidad de que al aumentar la frecuencia en la dosis de administración del jugo de limón en los medios de cultivo principalmente contra *Streptococcus β -hemolítico del grupo A a ATCC 19615* se logre aumentar el efecto inhibitorio y/o la eficacia antibacteriana *in vitro*, esto tendría que ser demostrado en futuras investigaciones.

En este estudio se determinó que las variedades de jugo de cítricos estudiados presentaron efecto inhibitorio *in vitro* contra *Streptococcus β-hemolítico del grupo A*, sin embargo, no es eficaz ya que no igualó o superó la media de inhibición de su control positivo y descarta la eficacia antibacteriana contra *Staphylococcus aureus meticilino resistente*. Para dicha conjetura se aplicó la prueba de Wilcoxon, y se obtuvo un valor p de 0.8166, por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula concluyendo que no hay suficiente evidencia para demostrar que el jugo de limón de las variedades estudiadas es eficaz para la inhibición de *Streptococcus β-hemolítico del grupo A* y *Staphylococcus aureus meticilino*, según los métodos aplicados en el laboratorio.

La debilidad que este estudio presenta es, que al momento de realizarlo no se contaba en el laboratorio clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas con una cepa ATCC de *Staphylococcus aureus meticilino resistente* por lo cual se utilizó un aislado clínico purificado, lo que podría haber influido en los resultados obtenidos.

Las fortalezas de este estudio son que existe inhibición del crecimiento de *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615* con la aplicación del jugo de los cítricos estudiados, así mismo, servirá de base para estudios posteriores sobre la utilización del mismo como profilaxis de enfermedades infecciosas, ya que su inhibición está demostrada *in vitro* con esta investigación.

8. CONCLUSIONES

8.1 Las variedades de jugo de limón: Criollo (*Citrus aurantifolia Swingle*), persa (*Citrus latifolia Tanaká*) real (*Citrus limón Burm*) y jugo de limón comercializado presentan efecto inhibitorio *in vitro* contra *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC*.

8.2 Las variedades de jugo de cítricos estudiados contra *Staphylococcus aureus metilino* resistente (aislado clínico) no demuestran efecto inhibitorio *in vitro*.

8.3 El limón real tiene mayor efecto inhibitorio *in vitro* contra *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615* con las dos técnicas estudiadas a concentración de 100% con un porcentaje de inhibición de 52,2%.

8.4 La mínima concentración de jugo de limón con la cual se logra efecto se obtiene a partir de la concentración al 75% mediante el uso de la réplica del método de difusión en discos de Bauer Kirby (técnica 1) y con la adaptación del método de Bauer Kirby a gota directa (técnica 2) a partir del 50%.

8.5 Ninguna de las especies de jugo de limón demuestra eficacia antibacteriana *in vitro* contra *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615* y *Staphylococcus aureus metilino resistente*; al aplicar la prueba de Wilcoxon no se obtiene suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula.

9. RECOMENDACIONES

9.1. A la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad San Carlos de Guatemala

- Estudiar las propiedades antimicrobianas de las diferentes partes del fruto y comparar el efecto inhibitorio contra *Streptococcus β -hemolítico del grupo A a ATCC 19615*, *Staphylococcus aureus metilino resistente* y con otros microorganismos patógenos.
- Aumentar la frecuencia de la administración de la dosis de jugo de limón en las cuatro variedades estudiadas mediante la adaptación del método de Bauer Kirby a gota directa contra *Streptococcus β -hemolítico del grupo A a ATCC 19615* y determinar si se logra eficacia antibacteriana.
- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de los cítricos y otras plantas medicinales haciendo uso de extractos de diferente polaridad con diferentes métodos de cultivo contra microorganismos patógenos para comparar el efecto inhibitorio.

9.2. Al área de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas del Centro Universitario Metropolitano:

- Promover dentro de la facultad de Ciencias Médicas la investigación científica mediante la realización de estudios experimentales en el Centro de Investigaciones Biomédicas para determinar y respaldar científicamente las propiedades antimicrobianas de las plantas medicinales con mayor uso en la población guatemalteca.

10. APORTES

Se pudo comprobar que el jugo de las especies de cítricos estudiados presentan efecto inhibitorio *in vitro* contra *Streptococcus β -hemolítico del grupo A* y se descarta la eficacia antibacteriana contra *Staphylococcus aureus metilino resistente*; aportando información científica que permite conocer las propiedades antibacterianas de los mismos, cabe mencionar que es un estudio innovador, ya que en trabajos experimentales nacionales e internacionales previos no se había incluido ambas técnicas estudiadas y no se había comparado el efecto inhibitorio *in vitro* con las diferentes variedades de jugo de limón. Proporciona información para ampliar el campo de estudio de los cítricos y sus propiedades antimicrobianas contra otros microorganismos patógenos, así mismo la presente investigación forma parte de un informe detallado que contiene un método estandarizado para el cultivo de *Streptococcus β -hemolítico del grupo A* y *Staphylococcus aureus metilino resistente*, el cual quedará a disposición del Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala como material de apoyo para la elaboración de futuras investigaciones, al Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se entregará una presentación tipo póster para ser colocado en el muro del laboratorio.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cruz SM. Medicina tradicional y fitoterapia una alternativa para el mejoramiento de la salud en Guatemala. Rev Ciencia tecnología salud [en línea]. 2016 [citado 29 Jul 2017]; 3(1): 81-90. Disponible en:
<http://digi.usac.edu.gt/ojsrevistas/index.php/cytes/article/view/99/111>
2. Vides Porras A, Álvarez Castañeda A. La medicina tradicional como un modelo de atención integral en salud. Rev UVG [en línea]. 2013 [citado 29 Jul 2017]; 25(7):58-60. Disponible en:
http://www.uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/numero25/7_la%20medicina%20tradicional.pdf
3. Cots JM, Alos JI, Barcena M, Boleda X, Cañada JL, Gomez N, et al. Recomendaciones para el manejo de la faringoamigdalitis aguda del adulto. Rev Farmacéuticos Comunitarios [en línea]. 2015 [citado 29 Jul 2017]; 47(8):532-543. doi:10.5672/FC.2173-9218.(2015/Vol1).001.04
4. Mohamed AE. Preliminary phytochemical and antibacterial screening of methanolic leaf extract of citrus aurantifolia. Pharm biotechnol curr res [en línea]. 2016 [citado 1 Ago 2017]; 1(2):1-5. Disponible en:
<http://www.imedpub.com/articles/preliminary-phytochemical-andantibacterial-screening-of-methanolicleaf-extract-of-citrusaurantifolia.php?aid=17512>
5. Echeverria A, Torres Idavoy D. Efecto de un extracto de petivera allicealin sobre el crecimiento de Giardia lamblia in vitro. Rev. Cubana Med Milit [en línea]. 2001 [citado 1 Ago 2017]; 30(3): 165-5. Disponible en:
www.scielo.sld.cu/pdf/mil/v30n3/mil04301.pdf
6. Organización Panamericana de la Salud. Medicina indígena tradicional y medicina convencional. [en línea]. Costa Rica: OPS; 2006. [citado 1 Ago 2017]. Disponible en: www.bvsde.paho.org/bvsapi/e/proyectreg2/paises/costarica/medicina.pdf

7. Batalla Sales M, García Domingo C, Monedero Mira MJ, Persiva Saura B, Rabanaque Mallen G, Tárrega Porcar L. Tratamiento empírico de las infecciones del adulto. Rev AGAMFEC [en línea]. [citado 3 Ago 2017]; 23(1): 9-10. doi: 10.1016/j.fmc.2015.12.002
8. Cáceres A, Samayoa B, Fletes L. Actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones [en línea]. Guatemala: USAC/DIGI;1991 [citado 3 Ago 2017]; Cuadernos 4-90. Disponible en: biblioteca.usac.edu.gt/folleto/USAC/digi/USAC_F_569.pdf
9. Pandey A, Kaushik A, KumarTiwari S. Evaluación de la actividad antimicrobiana y análisis fitoquímico de citrus limón. Rev. JPBMS [en línea]. 2011 [citado 29 Jul 2017]; 13(17): 1-7. Disponible en: www.jpbms.info/index.php?option
10. Pathan RK, Gali PR, Pathan P, Gowtham T, Pasupuleti S. In vitro antimicrobial activity of citrus aurantifolia and its phytochemical screening. Asian pacific journal of tropical disease [en línea]. 2012 [citado 29 Jul 2017]; 2(1):328-331. Doi: [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60176-5](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60176-5)
11. Bustamante Canelo OP, Delgado Rapos E. Efecto inhibitorio del jugo y desecado de limón citrus aurantifolia en *Staphylococcus* y *Escherichia coli*. Tzhoecoen [en línea]. 2015 [citado 24 Jul 2017]; 7(1):181-193. Disponible en: revistas.uss.edu.pe/index.php/tzh/article/view/187/186
12. Tam Burga MJ. Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de cáscara de citrus limon (limon) sobre *Staphylococcus aureus metilino resistente*. [tesis Médico y Cirujano en línea]. Perú: Universidad Privada Antenor Orrego Facultad de Medicina; 2015. [citado 30 Jul 2017]. Disponible en: <http://repositorio.upao.edu.pe/handle/upaorep/1710>
13. Amengialue O, Oviasogie EF, Omoigberale MNO, Omoregie BO, Okoro TC. Evaluation of antimicrobial potential and phytochemical screening of citrus lemon. Rev. EurInvAvan en Cien Biol [en línea]. 2016 [citado 29 Jul 2017]; 4(2):1-10. Disponible en: <http://www.idpublications.org/ejarbls-vol-4-no-2-2016/>

14. Oikeh EI, Omoregie ES, Oviasogie FE, Oriakhi k. Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates. *Food Science & Nutrition* [en línea]. 2016 [citado 30 Jul 2017]; 4(1):103-109. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4708628/>
15. Racowski I, Piotto J, Procópio V, Freire VT. Evaluation of antimicrobial activity and phytochemical analysis of thaiti lemon peels (*Citrus latifolia* Tanaka). *Rev. Journal of Microbiology Research* [en línea]. 2017 [citado 2 Jul 2017]; 7(2): 39-44. Doi: 10.5923/j.microbiology.20170702.03
16. Torres Manrique C. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming [en línea]. Zaragoza, España: Academia de Farmacia Reino de Aragón; 2012. [citado 26 Ago 2017]. Disponible en: <http://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/Documentos/Documento48.pdf>
17. Marcen Letosa JJ. Antimicrobianos naturales. *Rev. Med Nat* [en línea]. 2000 [citado 24 Ago 2017]; 2:104-108. Disponible en: dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/202443.pdf
18. Domínguez Vigil IG. Actividad anti-Giardia in vitro de los compuestos de *Foeniculum vulgare* y *Citrus aurantifolia*. [tesis Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia]. México: Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Farmacia; 2015. [citado 26 Jul 2017]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/76599430.pdf>
19. Servicio Nacional del Consumidor. Análisis de los jugos de limón y sucedáneos del jugo de limón envasados que se expenden en la región Metropolitana. [en línea]. Chile: SERNAC; 2001. [citado 26 Jul 2017]. Disponible en: www.sernac.cl/33805

20. Castillo Arroyo MV. Proyecto de factibilidad para la producción y comercialización del limón, en el municipio de el Júcaro, departamento de El Progreso. [tesis Ingeniero Industrial en línea]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería; 2010. [citado 24 Ago 2013]. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_1452_IN.pdf
21. León F. Gobierno del Estado de Chiapas. Sistema de producción ecológica: Limón Persa. Proyecto Desarrollo Social Integrado y Sostenible [en línea]. México: Gobierno del Estado de Chiapas; 2006 [citado 10 Jul 2017]. Disponible en: <https://www.scribd.com/document/300405491/Sistema-de-Produccion-SISTEMA-DE-PRODUCCION-ECOLOGICA-LIMON-PERSA-Citrus-aurantifolia-L-agroecologica-Del-Limon>
22. Quevedo ER. Evaluación del efecto de tres dosis de ácidos húmicos sobre el rendimiento y la calidad de limón persa (*Citrus latifolia*. Tan: *Rutaceae*). [tesis Ingeniero Agrónomo en línea]. Guatemala: Universidad Rafael Landívar, Facultad de Agronomía; 2012 [citado 21 Jul 2017]. Disponible en: <http://biblio3.url.edu.gt/Tesis/2012/06/17/Quevedo-Erick.pdf>
23. Guatemala. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Perfil comercial limón. [en línea]. Guatemala: MAGA.; 2014 [citado 10 Sep 2017]. Disponible en: <http://web.maga.gob.gt/download/Perfil%20limon.pdf>
24. Camacho M. La rentabilidad del limón mexicano (*Citrus aurantifolia Swingle*). [tesis de Maestría en línea]. México: Institución de Enseñanza e Investigación, Instituto de Socioeconomía, Estadística e Informática; 2004 [citado 26 Jul 2017]. Disponible en: <http://www.cm.colpos.mx/tesis/pdf/TMLCR2004.pdf>
25. Universidad Autónoma de México. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. [en línea]. México: UNAM; 2014 [citado 26 Jul 2017]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>
26. Pamplona Roger JD. El poder medicinal de los alimentos. España: Safeliz; 2006. Capítulo 5. Salud por los alimentos; p. 44-48

27. Fundación Universitaria Iberoamericana. Base de datos internacional de composición de alimentos: Limón real [en línea]. Ecuador: Fundación Universitaria Iberoamericana; 2017. [citado 20 Jul 2017]. Disponible en: <http://www.composicionnutricional.com/alimentos/LIMON-REAL-5>
28. Organización Panamericana de la Salud, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. Tabla de composición de alimentos de Centro América [en línea]. Panamá: INCAP/OPS; 2007. [citado 26 Jul 2017]. Disponible en: <http://www.incap.int/index.php/es/.../80-tabla-de-composicion-de-alimentos-de-centroamerica>
29. Florence J, Chevillotte H, Ollier C. National Inventory of Natural Heritage. *Citrus limetta* Risso. [en línea]. Francia: Inventaire National du Patrimoine Naturel; 2016 [citado 23 Ago 2017]. Disponible en: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/91808/tab/taxo?lg=en
30. COGUANOR NGO. Productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Jugo de limón especificaciones [en línea]. Guatemala: COGUANOR NGO; 1995. [citado 20 Jul 2017]. Disponible en: cretec.org.gt/wp-content/files_mf/ngo340091rarevisiónjuegodelimón.pdf
31. Rosenthal K. Streptococcus. En: Murray P, Pfaller M. editores. Microbiología médica. 7 ed. España: Elsevier; 2009: p. 221-227
32. Brown BA, Wallace RJ, Brooks GF. Staphylococcus y cocos grampositivos relacionados. En: Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. editores. Microbiología médica. 25 ed. México, D.F: Mc Graw Hill; 2011: p. 237-247
33. Kenneth J, Ryan W, Lawrence D. Bacterias patógenas: Estreptococos y enterococos. En: Ray C, Ahmad N, Plorde J. editores. Sherris microbiología médica. 5 ed. México: Mc Graw Hill; 2010: p. 342-362.

34. MacDougall C, Chambers H. Inhibidores de la síntesis de proteínas y diversos antibacterianos. En: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. editores. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12 ed. México: Mc Graw Hill; 2012: p. 1521-1543.
35. Deck D, Pharm D. Winston Lisa. Tetraciclinas, macrólidos, clindamicina, cloranfenicol, estreptograminas y oxazolidinonas. En: Katzung BG, Trevor AJ. Editores. Farmacología básica y clínica. 13 ed. México: Editorial Mc Graw Hill Interamericana; 2007. p. 1236-1238
36. Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer J. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. Am Soc Heal Pharm [en línea]. 2009 [citado 29 Jul 2017]; 31(1):551-566. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19106348>
37. Espadas Maciá D, Macián EMF, Borrás R, PoujoisGisbert S, Muñoz Bonet J. Infección por estreptococo pyogenes en la edad pediátrica: desde faringoamigdalitis aguda a infecciones invasivas. Rev. AnPediatr [en línea]. 2017 [citado 29 Jul 2017]; 88(2): 75-81: doi: 10.1016/j.anpedi.2017.02.011
38. Arnáiz García AM, Salas Venero C, Negueruela García B. Infecciones por estreptococo. Rev Medic (España) [en línea]. 2014 [citado 29 Jul 2017]; 11(59):3463-3476. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4873839>
39. Navarro Pérez RN, Narváez Altamirano HV, Osorio Rojas MN. Frecuencia de Streptococcus β -hemolítico grupo A, en niños que asisten al Centro de Desarrollo Infantil "Arlen Siu" de la UNAN- Managua en las edades de 1 a 5 años, en el periodo Septiembre-Diciembre de 2014. [tesis Bioanálisis Clínico en línea]. Nicaragua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN, Instituto Politécnico de la Salud Dr. Luis Felipe Moncada; 2014. [citado 26 Ago 2017]. Disponible en: <http://repositorio.unan.edu.ni/1022/1/63724.pdf>

40. Paredes F, Roca JJ. Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. Rev Farmac (México) [en línea]. 2004 [citado 26 Ago 2017]; 23(3): 117-124. Disponible en: www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13059414-S300
41. Cavalieri SJ, Harbeck RJ, Mc Carter YS, Ortez JH, Rankin ID, Sauter RL, et al. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana [en línea]. Washington: American Society for Microbiology; 2005. [citado 25 Ago 2017]. Disponible en: http://cidbimena.desastres.hn/docum/ops/libros/labs_sucep_antimicro.pdf
42. Prat MS. Susceptibilidad microbiana por difusión en agar: Sección de bacteriología. [en línea]. Chile: Instituto de Salud Pública; 2005 [citado 26 Ago 2017]. Disponible en: http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf
43. Panreac Cultimed. Manual básico de microbiología. Recomendaciones generales. [en línea]. España: AKRLAB; 2013. [citado 26 Ago 2017]. Disponible en: www.ictsl.net/downloads/microbiologia.pdf
44. Castro M, Lubo A, Ruiz J, Castro J, Insignares A. Sensibilidad y motilidad bacteriana [en línea]. España: Universidad del Atlántico, Facultad Química y Farmacia; 2012 [citado 26 Ago 2017]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/239552131/Sensibilidad-Bacteriana>.
45. Guatemala. Congreso de la República. Decreto número 18-93. Universidades, decreto 5-82 [en línea]. Guatemala: Congreso de la República; 1993. [citado 25 Jul 2017]. Disponible en: https://www.oas.org/juridico/mla/sp/gtm/sp_gtm-int-text-const.pdf
46. Guerra López CA, Robles González LG. Actividad antibacteriana de los extractos supercríticos del ajo (*Allium sativum* L), chichipin (*Hameliapatens* Jacq), orégano (*Lippia graveolens* Kunth) y té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) sobre el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. [tesis Médico y Cirujano en línea]. Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias

Médicas; 2014 [citado 13 Mayo 2017]. Disponible en:
www.repositorio.usac.edu.gt/1556/1/05_9414.pdf

47. Bernal M, Guzman M. El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby- Bauer. Rev. Biomed [en línea]. 1984 [citado 23 Ago 2017]; 4(3,4): 112-121. Disponible en:
<https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1891>
48. HiMedia Laboratories. Blood agar base (Infusion Agar) [en línea]. India: HiMedia; 2016 [citado 28 Sep 2017]. Disponible en: himedialabs.com/TD/M073.pdf
49. Merck Laboratories. Manual microbiology. Muller Hinton Agar. CLSI [en línea]. México: Merck; 2010 [citado 23 Ago 2017]. Disponible en:
<https://www.emdmillipore.com/.../ShowDocument-Pronet?id>
50. Azmitia Meng JA, Mazariegos López AV. Eficacia *in vitro* de los extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) frente a *Cándida albicans*. [tesis Médico y Cirujano]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas; 2017.
51. Cavalieri S. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. [en línea]. Lima, Perú: PAHO/WHO; 2005 [citado 27 Ago 2017]. Disponible en:
www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid...
52. Brizuela-Lab. Tabla de interpretación de los resultados método de difusión en Agar (Normas CLSI 2015) [en línea]. Córdoba, Argentina: Brizuela-Lab; 2012 [citado 28 Ago 2017]. Disponible en: www.brizuela-lab.com.ar/manuales/Tablan.pdf
53. Laboratorios Britania. Nueva distribución de discogramas Britania. Criterios de interpretación basados en el método de Kirby-Bauer de pruebas de sensibilidad para microorganismos de fácil crecimiento [en línea]. Argentina:

Britania SA. [citado 25 Ago 2017]. Disponible en:
http://www.britanialab.com.ar/espanol/k07_01.html

54. World Medical Association. Declaración de Helsinki de la AMM -Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos [en línea]. España: WMA, 2013. [citado 28 Jul 2017]. Disponible en:
www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd.../fd.../Declaracion-Helsinki-2013-Esp.pdf

55. Kadhim Hindi NK, Ghani Chabuck ZA. Antimicrobial activity of different aqueous lemon extracts. Journal of Applied Pharmaceutical Science [en línea]. 2013 [citado 2 Nov 2017]; 3 (06): 074-078. Doi: 10.7324/JAPS.2013.3611

56. Kumar Basak A, Chatterjee T, Majumder D, Zunaid Hussain S, Mallick S, Chakravarty A. Evaluation of antimicrobial potential of juices of some common citrus and non-citrus fruits of india. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci (India) [en línea]. 2017 [citado 2 Feb 2018]; 6(3): 725-731.
doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.084>



12. ANEXOS

Instrumento de recolección de datos

Tabla 12.1 Técnica 1: Método de difusión en discos de Bauer Kirby.

Zona de inhibición (mm) medición a las 24hrs							
Se hará comparación con el control positivo: Antibiogramas de azitromicina y vancomicina. *							
Jugo de limón criollo (<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle)					Control positivo		Control Negativo solución salina 0.9%
Concentración	25%	50%	75%	100%			
<i>S. aureus</i> metilino resistente	-	-	-	-	Azitromicina	23	-
					15mcg		
<i>S. β-hemolítico del grupo A</i>	-	-	7	9	Vancomicina	19	-
					30mcg		
Jugo de limón persa (<i>Citrus latifolia</i> Tanaká)							
<i>S.aureus</i> metilino resistente	-	-	-	-	Azitromicina	23	-
					15mcg		
<i>S. β-hemolítico del grupo A</i>	-	-	7	10	Vancomicina	19	-
					30mcg		
Jugo de limón real (<i>Citrus limonum</i> Burm)							
<i>S. aureus</i> metilino resistente	-	-	-	-	Azitromicina	23	-
					15mcg		
<i>S. β-hemolítico del grupo A</i>	-	-	7	12	Vancomicina	19	-
					30mcg		
Jugo de lima (<i>Citrus limetta</i> Risso)							
<i>Staphylococcus aureus</i> metilino resistente	-	-	-	-	Azitromicina	23	-
					15mcg		
<i>S. β-hemolítico del grupo A</i>	-	-	-	-	Vancomicina	19	-
					30mcg		
Jugo de limón comercializado (Rabinal)							
<i>S. aureus</i> metilino resistente	-	-	-	-	Azitromicina	23	-
					15mcg		
<i>S. β-hemolítico del grupo A</i>	-	-	-	10	Vancomicina	19	-
					30mcg		

Azitromicina 15mcg: Resistente: ≤13mm. Intermedio: 14-22mm. Sensible: ≥ 23mm

Vancimincina 30mcg: Resistente: ≤14mm. Intermedio 15-18mm. Sensible: ≥ 19mm

Tabla 12.2 Técnica 2: Adaptación del método de Bauer Kirby a gota directa.

Zona de inhibición (mm) medición a las 24hrs							
Se hará comparación con el control positivo: Antibiogramas de azitromicina y vancomicina.*							
Variedad de cítrico					Control positivo		Control negativo solución salina 0.9%
Jugo de limón criollo (<i>Citrus aurantifolia Swingle</i>)							
Concentración	25%	50%	75%	100%			
<i>S. aureus metilino resistente</i>	-	-	-	-	Azitromicina	23	-
					15mcg		
<i>S. β-hemolítico del grupo A</i>	-	7	8	9	Vancomicina	19	-
					30mcg		
Jugo de limón persa (<i>Citrus latifolia Tanaká</i>)							
<i>Staphylococcus aureus metilino resistente</i>	-	-	-	-	Azitromicina	23	-
					15mcg		
<i>S. β-hemolítico del grupo A</i>	-	-	10	10	Vancomicina	19	-
					30mcg		
Jugo de limón real (<i>Citrus limonum Burm</i>)							
<i>S. aureus metilino resistente</i>	-	-	-	-	Azitromicina	23	-
					15mcg		
<i>S. β-hemolítico del grupo A</i>	-	9	9	12	Vancomicina	19	-
					30mcg		
Jugo de lima (<i>Citrus limetta Risso</i>)							
<i>S.aureus metilino resistente</i>	-	-	-	-	Azitromicina	23	-
					15mcg		
<i>S. β-hemolítico del grupo A</i>	-	-	-	-	Vancomicina	19	-
					30mcg		
Jugo de limón comercializado (Rabinal)							
<i>S. aureus metilino resistente</i>	-	-	-	-	Azitromicina	23	-
					15mcg		
<i>S. β-hemolítico del grupo A</i>	0	9	9	11	Vancomicina	19	-

*Azitromicina 15mcg: Resistente: ≤13mm. Intermedio: 14-22mm. Sensible: ≥ 23mm

Vancimincina 30mcg: Resistente: ≤14mm. Intermedio 15-18mm. Sensible: ≥ 19mm

Tabla 12.3 Análisis de datos:

Cálculo de la media (\bar{x}) y varianza (σ^2) con los datos obtenidos en la medición a las 24hrs de los halos de inhibición contra Streptococcus beta hemolítico del grupo A mediante Método de difusión en disco Bauer Kirby (técnica 1).

Concentración del jugo de las variedades de cítricos	xi	\bar{x}	(xi- \bar{x})	(xi- \bar{x}) ²	$\frac{\sigma^2}{(xi-\bar{x})^2/n-1}$
Limón persa					
25%	-	4.25	-4.25	18.06	6.02
50%	-		-4.25	18.06	6.02
75%	7		2.75	7.56	2.52
100%	10		5.75	33.06	11.02
Limón criollo					
25%	-	4	-4	16.00	5.33
50%	-		-4	16.00	5.33
75%	7		3	9.00	3.00
100%	9		5	25.00	8.33
Limón real					
25%	-	4.75	-4.75	22.56	7.52
50%	-		-4.75	22.56	7.52
75%	7		2.25	5.06	1.69
100%	12		7.25	52.56	17.52
Limón comercializado (Rabinal)					
25%	-	4.25	-4.25	18.06	6.02
50%	-		-4.25	18.06	6.02
75%	7		2.75	7.56	2.52
100%	10		5.75	33.06	11.02

xi = Distribución de datos

\bar{x} = Media

σ^2 = Varianza

Tabla 12.4 Cálculo de la media y varianza con los halos de inhibición obtenidos contra *Streptococcus beta hemolítico del grupo A* a ATCC 19615 mediante adaptación del método de difusión de Bauer Kirby a gota directa (técnica 2).

Concentración del jugo de las variedades de cítricos	xi	\bar{x}	(xi- \bar{x})	(xi- \bar{x}) ²	σ^2
Limón persa					
25%	-	6.5	-6.5	42.25	14.08
50%	6		-0.5	0.25	0.08
75%	10		3.5	12.25	4.08
100%	10		3.5	12.25	4.08
Limón criollo					
25%	-	6	-6	36.00	12.00
50%	7		1	1.00	0.33
75%	8		2	4.00	1.33
100%	9		3	9.00	3.00
Limón real					
25%	-	7.5	-7.5	56.25	18.75
50%	9		1.5	2.25	0.75
75%	9		1.5	2.25	0.75
100%	12		4.5	20.25	6.75
Jugo de limón comercializado					
25%	-	7.25	-7.25	52.56	17.52
50%	9		1.75	3.06	1.02
75%	9		1.75	3.06	1.02
100%	11		3.75	14.06	4.69

xi = Distribución de datos
 \bar{x} = Media
 σ^2 = Varianza

Resultados

Tabla 12.5 Distribución del efecto inhibitorio *in vitro* medido en milímetros (mm) del jugo de limón persa (*Citrus latifolia Tanaká*), real (*Citrus limón Burm*), y jugo de limón comercializado (Rabinal®) contra *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615* utilizando el método de difusión en discos de Bauer Kirby (técnica 1).

Variedad de cítrico al 100%	Efecto inhibitorio
Jugo de limón persa	10 mm
Jugo de limón real	12 mm
Jugo de limón comercializado	10 mm

Tabla 12.6 Distribución del efecto inhibitorio *in vitro* medido en milímetros (mm) del jugo de limón persa (*Citrus latifolia Tanaká*), real (*Citrus limón Burm*), y jugo de limón comercializado (Rabinal®) contra *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615* mediante el método de Bauer Kirby adaptado a gota directa (técnica 2).

Variedad de cítrico al 100%	Efecto inhibitorio
Jugo de limón persa	10 mm
Jugo de limón real	12 mm
Jugo de limón comercializado	11 mm

Tabla 12.7 Concentración mínima de jugo de los cítricos estudiados que presentaron efecto inhibitorio *in vitro* contra *Streptococcus β-hemolítico del grupo A a ATCC 19615*.

Jugo de limón real	
técnica de Bauer Kirby 75%	7 mm
técnica de Bauer Kirby con gota directa 50%	9 mm

Tabla 12.8 Determinación de la eficacia antibacteriana *in vitro* del jugo de limón persa (*Citrus latifolia Tanaká*), criollo (*Citrus aurantifolia Swingle*), limón real (*Citrus limonum Burm*), lima (*Citrus limetta Risso*) y jugo de limón comercializado (Rabinal®).

Jugo de limón real	12 mm
Control positivo de azitromicina contra <i>Streptococcus</i> β -hemolítico del grupo A a ATCC 19615	23 mm
Control negativo con solución salina	-